

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Professor Dr. med. M.D. Menger)

Leukozytenrekrutierung in der pulmonalen Mikrozirkulation nach ausgedehnter Leberresektion:
Einfluss der Hemmung der Xanthinoxidoreduktase sowie der simultanen Milzresektion
Eine *in vivo* Studie am Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2016

vorgelegt von Michael Schultheis geboren am 12.01.1990

Dekan: Prof. Dr. med. Michael Menger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Menger

2. Gutachter:

Datum der Promotion:

Diese Arbeit ist in Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary	4
3. Einleitung	6
3.1 Indikation zur Leberresektion	6
3.2 Resektionstechniken in der Leberchirurgie.....	6
3.3 Komplikationen nach Leberresektion.....	8
3.4 ALI und ARDS	9
3.5 Leukozytenrekritierung in der Lunge	12
3.6 Überblick über Aufbau, Verteilung und Funktion der Xanthinoxidoreduktase.....	14
3.7 Febuxostat	15
3.8 Grundlagen der Anatomie und Physiologie der Milz	15
3.9 Splenektomie.....	16
4. Ziel der Studie.....	18
5. Material und Methoden	19
5.1 Versuchstiere	19
5.2 Modell.....	20
5.2.1 Operative Modelle.....	20
5.3 Mikroskopische Analyse	23
5.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	23
5.4.1 Mikrovaskuläre Parameter.....	25
5.5 Wet-to-Dry Weight Ratio.....	29
5.6 Histologie	29
5.6.1 Immunhistochemie.....	29
5.7 Western Blot	31
5.8 Versuchsprotokoll.....	36
5.8.1 Versuchsgruppen	36
5.8.2 Timeline.....	36
5.9 Statistik	37

6. Ergebnisse	38
6.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	38
6.1.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	38
6.1.2 Mikrohämodynamik	47
6.2 Wet-to-Dry Weight Ratio.....	48
6.3 Histologische/ Immunhistochemische Ergebnisse	49
6.3.1 Aktivierte cleaved Caspase-3	49
6.3.2 Myeloperoxidase Färbung	51
6.5 Ergebnisse Western-Blot Analyse	53
6.5.1 MPO-Expression.....	53
6.5.2 Aktivierte Caspase-3-Expression	54
6.5.3 Xanthindehydrogenase-Expression	56
6.5.4 Xanthinoxidase-Expression.....	57
7. Zusammenfassung der Ergebnisse	59
7.1 Einfluss einer ausgedehnten Leberresektion auf die Mikrozirkulation der Lunge	59
7.2 Einfluss der Inhibition der Xanthinoxidoreduktase auf die Mikrozirkulation der Lunge nach ausgedehnter Leberresektion.....	59
7.3 Einfluss einer im Rahmen der Leberresektion durchgeführten Splenektomie auf die Mikrozirkulation der Lunge	60
8. Diskussion	61
8.1 Diskussion des Modells	61
8.1.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	61
8.1.2 Leberresektion	63
8.2 Diskussion der Ergebnisse	65
8.2.1 Die erweiterte Leberresektion führt zu einer Leukozytenakkumulation in der Lunge.....	65
8.2.2 Febuxostat hemmt die Leukozytenakkumulation in der Lunge nach einer erweiterten Leberresektion	68
8.2.3 Einfluss der simultanen Splenektomie auf die Leukozytenakkumulation in der Lunge.....	71
9. Danksagung	73
10. Lebenslauf.....	74

11. Veröffentlichungen	75
11.1 Abstracts/Manuskripte	75
11.2 Kongressbeiträge/zitierfähiges Abstract.....	75
12. Quellen.....	76

1. Zusammenfassung

Die Leberresektion stellt ein wichtiges therapeutisches Verfahren dar, um primäre und sekundäre Tumorerkrankungen zu behandeln und zu heilen. Eine Leberresektion geht mit einer Komplikationsrate von bis zu 50% einher. Eine schwerwiegende Komplikation ist der akute Lungenschaden (Acute Lung Injury = ALI). Es konnte nachgewiesen werden, dass ein abdominalchirurgischer Eingriff zu einer systemischen Entzündungsreaktion des Körpers führt. Dieser Prozess führt zu einer vermehrten Rekrutierung von Leukozyten in der Lunge. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffmolekülen (Reactive Oxygen Species = ROS) bewirkt eine Schädigung des Lungengewebes. Febuxostat, ein selektiver Hemmer der Xanthinoxidoreduktase (XOR), kann die Leukozytenrekritierung in einer Entzündungsreaktion reduzieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine simultan zur Leberresektion durchgeführte Milzresektion die Mortalität eines leberchirurgischen Eingriffs senkt. Es war daher Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, ob die Behandlung mit Febuxostat sowie eine simultan zur Leberresektion durchgeführte Milzresektion die Leukozytenrekritierung in der Lunge reduziert und dadurch protektive Effekte auf das Lungengewebe bewirkt.

24h und 1h vor ausgedehnter Leberresektion wurden C57/BL6 Mäuse (n=8) mit Febuxostat (10mg/kg KG) behandelt. 24h nach Leberresektion wurde bei den Tieren die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Lunge durchgeführt und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion analysiert. Danach wurde jedem Tier Lungengewebe entnommen, um die Expression von Myeloperoxidase (MPO) sowie aktivierter Caspase-3 zu analysieren. Die Ergebnisse wurden mit Tieren verglichen, die ausschließlich einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden (n=8). Tiere, die einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden, wurden mit Sham-operierten Tieren verglichen (n=7). Bei Tieren mit einer simultan zur Leberresektion durchgeführten Splenektomie (n=7) wurde auf gleiche Weise verfahren.

Eine ausgedehnte Leberresektion führt zu einem signifikanten Anstieg der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Arteriolen, Venolen und Kapillaren der Lunge im Vergleich zu Sham-operierten Tieren. Die Behandlung mit Febuxostat vor einer Leberresektion führte zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Dies bewirkte auch eine deutliche Reduktion an MPO-positiven Zellen in der Lunge sowie eine signifikante Reduktion

der Apoptose im Lungengewebe. Durch eine simultan zur Leberresektion durchgeführten Milzresektion konnte eine geringe Reduktion der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Venolen, Arteriolen oder Kapillaren der Lunge festgestellt werden. Jedoch konnte die Apoptoserate im Lungengewebe deutlich gesenkt werden. Insbesondere konnte die Anzahl an MPO-positiven Zellen im Lungengewebe durch eine Splenektomie signifikant gesenkt werden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Inhibierung der XOR durch Febuxostat sowie die simultan zur Leberresektion durchgeführte Milzresektion die Leukozytenrekrutierung reduziert und einen protektiven Effekt auf das Lungengewebe hat. Dieser Ansatz könnte vor postoperativen pulmonalen Komplikationen, die nach einem leberchirurgischen Eingriff auftreten, schützen.

2. Summary

Liver resection is a key method to treat and cure primary and secondary liver tumors. However, the morbidity rates are still up to 50%. One reason for the high morbidity is the acute lung injury. Acute lung injury (ALI) is a major cause for morbidity and mortality after extended liver resection. Recent studies have shown that after surgery patients may develop a systemic inflammation with accumulation of leukocytes within the lung. These leukocytes cause further damage of the lung tissue by production of reactive oxygen species (ROS). Febuxostat, an inhibitor of the xanthine oxidase, has been shown capable of reducing the accumulation of leukocytes in inflammation. Furthermore, it was shown that a simultaneous splenectomy to an extended hepatectomy may have protective effects in hepatic surgery. Herein we hypothesized that pretreatment with febuxostat or a simultaneous splenectomy reduces the accumulation of leukocytes in the lung after extended liver resection and, thus, may have protective effects to reduce lung injury.

C57BL/6 (n=8) mice were treated with febuxostat (10mg/kg BW) 24h and 1h before 68% liver resection. Twenty-four hours after liver resection, intravital fluorescence microscopy of pulmonary venules, arterioles and capillaries was performed to study the pulmonary microcirculation and leukocyte endothelial cell interaction. After intravital fluorescence microscopy, lung tissue was harvested for analysis of myeloperoxidase (MPO) and cleaved caspase-3. Results were compared to animals which underwent extended liver resection without febuxostat pretreatment (n=8) and to animals which underwent laparotomy only (sham; n=7). Identical studies were performed with mice which received a simultaneous splenectomy beside the hepatectomy (n=7).

Extended liver resection significantly increased leukocyte endothelial cell interaction in pulmonary arterioles, venules and capillaries compared to sham-treated animals. Pretreatment with febuxostat significantly attenuated leukocyte endothelial cell interaction in pulmonary arterioles and venules. Decreased leukocyte endothelial cell interaction within the pulmonary microcirculation of febuxostat-treated animals lead to a marked decrease in the number of MPO-positive cells within the lung tissue, which was associated with a reduced rate of apoptosis. A simultaneous splenectomy beside the hepatectomy also showed positive effects on the lung

tissue. We found that the simultaneous splenectomy attenuated leukocyte endothelial cell interaction in pulmonary arterioles and venules, especially the histologic parameters, such as the MPO, were significantly decreased compared to Sham-treated animals.

The present study shows that inhibition of xanthine oxidase with febuxostat as well as a simultaneous splenectomy reduces the accumulation of leukocytes in the lung after liver resection and exerts protective effects to the lung tissue. This may help to prevent secondary pulmonary complications after liver surgery.

3. Einleitung

3.1 Indikation zur Leberresektion

In der aktuellsten Veröffentlichung der Serie „Krebs in Deutschland“ des Robert Koch-Instituts aus dem Jahr 2015 wurden in einem Jahr 8580 Neuerkrankungen an malignen Lebertumoren registriert. Im gleichen Jahr verstarben in Deutschland 7670 Menschen an malignen Lebertumoren (Kaatsch et al., 2015).

Die Leberresektion ist der Goldstandard zur Behandlung von primären und sekundären Tumorerkrankungen der Leber. Hierbei kann zwischen benignen und malignen Tumorerkrankungen unterschieden werden (Dimitroulis et al., 2014). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Tumoren der Leber.

Maligne Tumore		Benigne Tumore
<i>primär</i>	<i>sekundär</i>	
hepatozelluläres Karzinom	kolorektales Karzinom	Zyste
cholangiozelluläres Karzinom	andere	Fokal noduläres Hämangiom
mesenchymale Tumore		Leberhämangiom
embryonale Tumore		Leberzelladenom

Tabelle 1: Maligne und benigne Leberzelltumore. Tabelle erstellt nach (Choi und Nguyen, 2005; Jonas et al., 2007; Kornasiewicz et al., 2014; Scaife, 2008; Tischoff und Tannapfel, 2007).

3.2 Resektionstechniken in der Leberchirurgie

Bedingt durch die anatomische Aufteilung von Arteria hepatica, Vena porta und Gallenwegen teilt sich die Leber in einen rechten und linken Leberlappen (Anderhuber und Bremer, 2003). Die weitere Aufteilung dieser anatomischen Strukturen ergibt eine, wie erstmals 1957 von Couinaud (Couinaud, 1957) beschrieben, segmentale Aufteilung in acht Segmente, die sich funktionell in weitere Subsegmente bis hin zu 1654 von Glisson beschriebenen Läppchenstrukturen aufteilen. Jedes dieser Segmente wird von der Vena porta sowie der Arteria hepatica mit Blut versorgt.

Außerdem entspringt aus jedem Segment ein Gallengang. Diese drei Strukturen bilden die portale Trias. Es gibt jedoch insbesondere bei der arteriellen Versorgung und dem Gallengangssystem eine große anatomische Vielfalt.

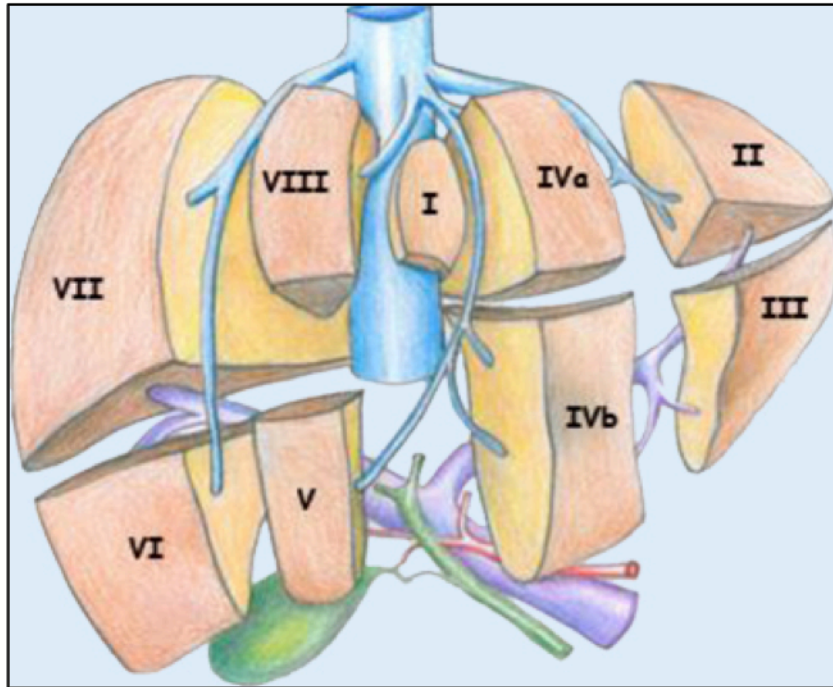


Abbildung 1: Segmentale Aufteilung der Leber nach Couinaud in acht Segmente aus: *Pädiatrische Lebertransplantation* (M. Melter 2012).

Der segmentale anatomische Aufbau der Leber nach Couinaud sowie die physiologische Reserve- und Regenerationsfähigkeit der Leber ermöglichen Leberresektionen zu 75-80% (Lee und Hwang, 2005).

Bei der Resektion unterscheidet man zwischen anatomischer und atypischer Resektion. Die anatomische Resektion orientiert sich an den Segmentgrenzen. Hier werden einerseits die anatomischen Strukturen von Vena porta, Arteria hepatica und Gallengang, andererseits aber auch der lebervenöse Abstrom über die Venae hepaticae berücksichtigt (Lang, 2007). Bei einer Hemihepatektomie wird der Hauptast der Arteria hepatica, Vena porta und Gallengang mit den entsprechenden Venae Hepaticae verschlossen. Nach der Brisbane-Klassifikation werden die Resektionsmaße unterschieden (Tabelle 2) (Strasberg, 2005).

Couinaud-Segmente	Leberresektion
Eines der Segmente I-IV	segmentorientierte Resektionen
Segmente IVa/b, V, VIII, \pm I	zentrale Leberresektion
Segment V-VII, \pm I	Hemihepatektomie rechts
Segment II-IV, \pm I	Hemihepatektomie links
Segment IV, V-VIII, \pm I	erweiterte Hemihepatektomie rechts
Segmente II-V; VIII, \pm I	erweiterte Hemihepatektomie links

Tabelle 2: *Brisbane Klassifikation; Leberresektion nach Couinaud Segmenten.*

Bei der atypischen Resektion werden die Segmentgrenzen nicht berücksichtigt. Hier ist ein gezielter Verschluss der Gefäße nicht möglich, sodass sich vor Beginn der Resektion ein Pringle-Manöver anbietet. Es wird versucht einen Sicherheitsabstand von 1cm zum Tumor einzuhalten (Pawlik et al., 2005).

Zur Resektion werden verschiedene Geräte und Techniken benutzt. Früher wurde das Gewebe mittels „finger-fracture“-Technik getrennt. Man stellte durch Zerquetschung des Parenchyms durch die Finger Gefäße und Gangstrukturen dar, welche daraufhin ligiert werden konnten (Gans et al., 1974). Heutzutage werden bei der Parenchymdurchtrennung Ultraschall-Verfahren oder Hydrojet-Verfahren angewendet. Hierbei werden intraparenchymatöse Gefäß- und Gangstrukturen dargestellt und können daraufhin ligiert oder geclippt werden (Rau et al., 2001).

3.3 Komplikationen nach Leberresektion

Die postoperative Morbidität nach Leberresektion liegt bei bis zu 50% (Benzoni et al., 2006). Die Mortalität liegt bei diesem Eingriff, abhängig von der Erfahrung des Operateurs, bei unter 5% (Song et al., 2005).

Spezifische Komplikationen nach Leberresektion sind vor allem Gallenleckage und Leberinsuffizienz. Zu den unspezifischen Komplikationen nach Leberresektion zählen Infektionen der Bauchhöhle oder Wundfläche und Blutungen (Jin et al., 2013). Aber auch pulmonale Komplikationen liegen in einigen Studien bei bis zu 9% (Ulubay et al., 2015). Neben der respiratorischen Insuffizienz wird die Pneumonie als zweithäufigste pulmonale postoperative Komplikationen beschrieben (Ates et al., 2015; Jarnagin et al., 2002). In schwerwiegenden Fällen

kann es zu dem acute respiratory distress syndrome (ARDS) oder einem akuten Lungenschaden (acute lung injury = ALI) kommen, welcher mit einer Mortalität von bis zu 65% vergesellschaftet ist (Monchi et al., 1998). Dabei zeigen insbesondere ältere Patienten ein signifikant höheres postoperatives pulmonales Komplikationsrisiko (Hirokawa et al., 2013).

3.4 ALI und ARDS

1992 definierte die American and European Consensus Conference ALI und ARDS durch folgende klinische Kriterien:

- Akut einsetzend
- - ARDS: Der Quotient des Sauerstoffpartialdrucks im arteriellen Blut (PaO_2) zur inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2) ≤ 200 mmHg
- - ALI: Bei $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 200 - 300$ mmHg
(unabhängig des positiven endexpiratorischen Drucks)
- In einer frontalen Röntgenaufnahme des Thorax sind bilaterale Infiltrate in der Lunge zu erkennen
- Der pulmonal arteriöse Wedge-Druck ≤ 18 mmHg (Bernard et al., 1994).

Neuerdings wird nach den Berliner Kriterien unterschieden. Hier entfällt die Unterscheidung zwischen ARDS und ALI. Folgende Kriterien müssen erfüllt sein:

- Akuter Beginn: Innerhalb einer Woche nach einem akuten Ereignis oder neu aufgetretenen bzw. verschlechterten respiratorischen Symptomen
- Bilaterale Verdichtungen in der Bildgebung: Verdichtungen lassen sich nicht allein durch ein Erguss, ein Pneumothorax oder ein Rundherde erklären
- Ausschluss kardialer Genese oder Überwässerung: Das Lungenversagen ist nicht allein durch eine akute Herzinsuffizienz oder Volumenüberladung erklärbar
- Es werden drei Schweregrade unterschieden:
 - mild: $(\text{PaO}_2)/(\text{FiO}_2) = 201-300$ mmHg, bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) ≥ 5 cm H_2O .
 - moderat: $(\text{PaO}_2)/(\text{FiO}_2) = 101-200$ mmHg, bei PEEP ≥ 5 cm H_2O
 - schwer: $(\text{PaO}_2)/(\text{FiO}_2) \leq 100$ mmHg, bei PEEP ≥ 5 cm H_2O (Force et al., 2012).

In der akuten Phase des ALI kommt es zu einer Ansammlung proteinreicher Flüssigkeit in den Alveolen auf Grund einer erhöhten Permeabilität des Kapillarendothels und Alveolarepithels. Ein Schaden am Endothel sowie an Typ-I-Alveolarepithelzellen führt zu einer Einschränkung der Kapillar-Epithel Barrierefunktion mit der Folge eines pulmonalen Ödems. Weiterhin kommt es, bedingt durch die eingeschränkte Barrierefunktion, zu einer Akkumulation von Leukozyten, Erythrozyten und Zytokinen in der Alveole. Ein Schaden an Typ-II-Alveolarepithelzellen führt durch verminderte Surfactantbildung zu einer erhöhten Oberflächenspannung und dadurch zu einem Kollaps der Alveole (Matthay et al., 2012; Ware und Matthay, 2000).

Neben der direkten Schädigung des Lungenparenchyms, beispielsweise im Rahmen einer Pneumonie oder der Aspiration von Mageninhalt (Ware und Matthay, 2000), kann ein akuter Lungenschaden auch durch indirekte Ursachen entstehen. So wurde bereits gezeigt, dass eine systemische Entzündungsreaktion des Körpers wie bei einem systemic-inflammatory-response-syndrom (SIRS) ebenfalls ein ALI verursachen kann (Du et al., 2012).

Ursächlich für ein SIRS können ein Trauma, eine Operation, eine Pankreatitis oder eine bakterielle Translokation sein (Bone et al., 1992; Hatakeyama und Matsuda, 2014; Marik und Flemmer, 2012). Ein SIRS ist eine überschießende Reaktion des Immunsystems ohne infektiöse Ursache (Fang et al., 2015). Ursächlich für die systemische Entzündungsreaktion des Körpers ist die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Bindung exogener Moleküle, wie Bestandteile von Bakterien (Pathogen-associated molecular patterns = PAMPs) oder endogener Moleküle (Damage-associated molecular patterns = DAMPs), welche zum Beispiel bei einem Trauma freigesetzt werden. Diese werden von sogenannten Pattern recognition receptors (PRRs) erkannt (Vollmar, 2011), welche unter anderem auf unterschiedlichen Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen oder natürlichen Killer Zellen exprimiert werden (Medzhitov und Janeway, 1997). Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt zu einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (Vollmar, 2011).

Ein operatives Trauma, wie es beispielsweise im Rahmen durch eine ausgedehnten Leberresektion entsteht, führt postoperativ zu einem Anstieg an proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-6, IL-8 und IL-10 (Kimura et al., 2006). Nach einer Operation sind Zytokine wichtige Trigger, um das angeborene Immunsystem, unter anderem neutrophile Granulozyten

und Makrophagen, zu aktivieren (Watt et al., 2015). Ein SIRS führt so zu einer systemischen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Bhatia und Moochhala, 2004).

Während eines SIRS kommt es zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der Lunge (Brown et al., 2006; Du et al., 2012; Steinberg et al., 1994). In der Pathogenese des akuten Lungenschadens nimmt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine zentraler Rolle ein (Brealey und Singer, 2000). Eine fehlregulierte Entzündungsreaktion mit Leukozyten- und Thrombozytenaktivierung sind dabei wichtige Aspekte (Matthay et al., 2012). Es werden unter anderem Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), IL-6 und IL-8 ausgeschüttet (Du et al., 2012). Dadurch werden neutrophile Granulozyten in die Alveole rekrutiert, indem sie aus dem Blutgefäß transendothelial und transepithelial in den Alveolarraum migrieren (Bhatia et al., 2012).

Neutrophile Granulozyten sind in erster Linie für die Abwehr und die Zerstörung von eindringenden Pathogenen verantwortlich. Das Pathogen wird durch eine Kombination von oxidativen (ROS) und nicht oxidativen Mechanismen (Enzyme, Proteasen) zerstört (Fang et al., 2015). Neutrophile Granulozyten schütten Mediatoren wie Zytokine, Proteasen und ROS aus, die zu einer Schädigung der Lunge führen (Brown et al., 2006; Dushianthan et al., 2011). ROS führen über verschiedene Mechanismen zu Veränderungen in der Lunge. ROS, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), reagieren mit zellulären Untereinheiten. Sie oxidieren Proteine, Lipide, DNA (Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure) Basen, Enzyme sowie extrazelluläre Matriceinheiten wie Kollagen und Hyaluronsäure. Abhängig von der Stärke des oxidativen Stresses kann es zur Apoptose oder auch zur Nekrose des betroffenen Gewebes kommen. Funktionsverluste der Epithel- und Endothelzellen, bedingt durch Oxidation von Strukturmolekülen, können zur Einschränkung der mikromolekularen Barrierefunktion führen (Sanders et al., 1999). So können ROS eine Entzündung, Gewebeschaden und Funktionsstörungen der Lunge hervorrufen. Als Quelle dieser ROS sind die XOR, die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAD(P)H) Oxidoreduktase der Elektronentransporter im Mitochondrium und Enzyme, die im Metabolismus der Arachidonsäure vorkommen, bekannt (Sanders et al., 1999).

3.5 Leukozytenrekrutierung in der Lunge

Die Rekrutierung von Leukozyten in ein „Zielgewebe“ setzt sich typischerweise aus mehreren Schritten zusammen (Wang et al., 2013;A). Initial „rollen“ aktivierte Leukozyten mit deutlich niedrigerer Geschwindigkeit im Vergleich zur Blutflussgeschwindigkeit am Endothel entlang (Atherton und Born, 1973). Entsprechend wird dieser Vorgang als Leukozyten-Rolling beschrieben. Hierbei binden Leukozyten über die Glykoproteine, P-, E- und L-Selektin, kurzfristig an Endothelzellen. P- und E-Selektin werden auf der Oberfläche von Endothelzellen, die durch Zytokine aktiviert wurden, exprimiert. L-Selektin befindet sich auf Leukozyten (Reddy und Standiford, 2010). Selektine gehen eine Verbindung mit Glykoprotein-Counter-Liganden ein. P-Selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), ein Glykoprotein-Counter-Ligand, wird auf Leukozyten exprimiert und interagiert mit P-Selektin, sowie im geringen Maße mit E-Selektin und L-Selektin (Cummings, 1999; Roller et al., 2013).

Eine stabile, dauerhafte Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen wird in erster Linie über β_2 -Integrine (Cluster of Differentiation (CD)11a/CD18 und CD11b/CD18) auf den Leukozyten und auf Endothelzellen exprimierten Adhäsionsmolekülen (ICAM = Intercellular-Adhesion-Molecule und VCAM = Vascular Cell Adhesion Molecule) vermittelt. Dies stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Transmigration der Leukozyten ins Gewebe dar (Reddy und Standiford, 2010). Adhärenente Leukozyten migrieren entweder zwischen zwei oder mehreren Endothelzellen oder transzellulär in das Gewebe (Reutershan und Ley, 2004) (Abb. 2).

Jedoch scheint die Leukozytenrekrutierung in der Lunge komplexer als in anderen Organen abzulaufen (Wang et al., 2013;A). Abhängig vom Stimulus der Entzündung können die Leukozyten in den Gefäßen der Lunge sowohl abhängig als auch unabhängig von β_2 -Integrinen rekrutiert werden (Doerschuk, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Leukozytenadhärenz in der Lunge nur bedingt abhängig vom Leukozyten-Rolling ist (Wang et al., 2013;B). Außerdem legen Studien dar, dass die Leukozytenadhärenz in den Kapillargefäßen der Lunge vor allem durch mechanische Faktoren beeinflusst wird und nicht allein durch Adhäsionsmoleküle vermittelt ist (Doerschuk et al., 1993; Worthen et al., 1989). So konnte gezeigt werden, dass die systemische Entzündung über eine vermehrte F-Aktin-Polymerisation eine Abnahme der Verformbarkeit der Leukozyten mit vermehrten Leukozyten-Trapping in pulmonalen Kapillaren zur Folge hat (Wang et al., 2013;B; Worthen et al., 1989). Weiterhin

beeinflusst die Komplexbildung von Leukozyten mit Thrombozyten die Rekrutierung der Leukozyten innerhalb des pulmonalen Kapillarnetzwerkes, da die Leukozyten-Thrombozyten einen größeren Durchmesser haben (Roller et al., 2013). Viele Details der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Lunge sind auf Grund der Schwierigkeit, die Lungengefäße intravital zu mikroskopieren, ungeklärt (Wang et al., 2013;A). Es ist weiterhin nicht klar, welcher Abschnitt der pulmonalen Mikrozirkulation verantwortlich für die Rekrutierung der Leukozyten nach ausgedehnter Leberresektion ist.

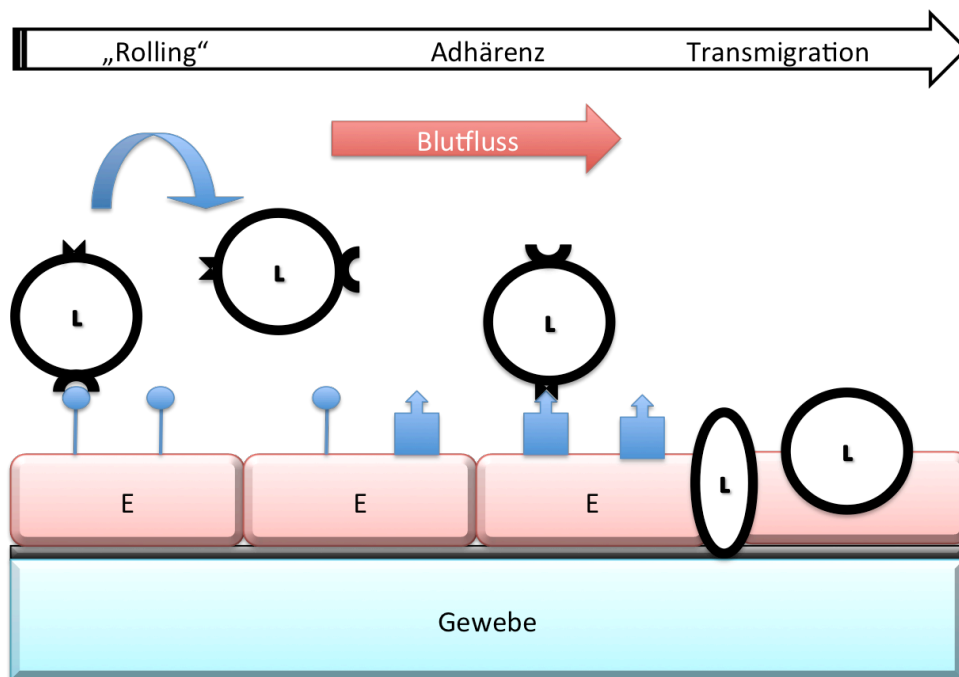


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothel-Interaktion. Zirkulierende Leukozyten (L) interagieren zufällig mit den Endothelzellen (E) der Gefäßwand. Die erste, nicht dauerhafte Phase der Interaktion, das „Rolling“, wird über Selektine (●) auf Endothelzellen vermittelt. Bei weiterer Aktivierung wird eine dauerhafte Verbindung zwischen Endothelzelle und Leukozyt über Integrine (▼) auf Leukozyten mit auf Endothelzellen präsentierten Bindungsmolekülen (■) der Immunglobulinen-Superfamilie wie VCAM oder ICAM gesteuert. Der letzte Schritt, die Transmigration ins Gewebe, findet parazellulär sowie transzellulär statt.

3.6 Überblick über Aufbau, Verteilung und Funktion der Xanthinoxidoreduktase

Die XOR nimmt im Purinbasenstoffwechsel eine zentrale Rolle ein. Beim Abbau der Purinbasen oxidiert die XOR Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure (Harrison, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die XOR ebenfalls ein Schlüsselenzym in der Entstehung von ROS darstellt (Battelli et al., 2014).

Die XOR existiert in zwei ineinander überführbaren Isoformen. Im Organismus liegt XOR häufiger in der Xanthindehydrogenase (XDH) Form vor. Durch posttranslationale Modifikation entsteht aus der XDH die Xanthinoxidase (XOD). XDH kann reversibel oder irreversibel durch proteolytische Veränderungen in die XOD überführt werden (Harrison, 2002). Die XDH verwendet hauptsächlich NAD^+ als Cofaktor. Die XOD dagegen kann sowohl NAD^+ aber auch insbesondere O_2 als Elektronenakzeptor nutzen. Dadurch entstehen ROS wie H_2O_2 oder Superoxid Radikale (O_2^-) (Nishino et al., 2008).

Die XOR wird in verschiedenen Organen und Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die Enzymaktivität im Dünndarm-, Lungen- und Lebergewebe am höchsten (Kurosaki et al., 1995). Ebenfalls kann man im Kapillarendothel von Darm, Leber und Lunge die XOR nachweisen (Jarascch et al., 1981).

Bereits früher konnte gezeigt werden, dass verschiedene Krankheitsbilder zu einer Erhöhung der XOD führen. Ein ARDS, Erkrankungen der Leber, sowie Ischämie/Reperfusionssverletzungen führen zu einer erhöhten Aktivität der XOD (Battelli et al., 2001; Granger et al., 1986; Grum et al., 1987). Außerdem geht man davon aus, dass die XOR eine direkte und indirekte Rolle in Prozess der Leukozytenrekrutierung spielt (Meneshian und Bulkley, 2002). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der XOD bei der Expression von P-Selektin und ICAM-1 in der Lunge eine Rolle spielt und mit erhöhter Leukozytenrekrutierung einhergeht (Terada et al., 1997). Entsprechend konnten Nomura et al. zeigen, dass die Inhibition der XOD zu einer verminderten Expression von bestimmten Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ und zu einer verminderten Expression von leukozytären Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen wie VCAM-1 führt (Nomura et al., 2013). Analog zu dieser Studie wurde gezeigt, dass die Hemmung der XOD zu einer systemischen Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ führt (Demirel et al., 2012).

Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition der XOD anti-inflammatorische Wirkung und protektive Effekte in Ischämie/Reperfusion (I/R)- oder ALI-Modellen aufweist (Shafik, 2013; Wright et al., 2004). Ob die Gabe eines XOD-Inhibitors, wie Febuxostat, die Leukozytenrekrutierung in das Lungengewebe nach einer ausgedehnten Leberresektion vermindern kann, konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.

3.7 Febuxostat

Febuxostat, 2-(3-Cyan-4-isobutyloxyphenyl)-4-methylthiazol-5-carbonsäure, ist ein selektiver, nicht-purinverwandter XOR Inhibitor. Febuxostat verhindert eine Interaktion des Substrates, das heißt von Hypoxanthin oder von Xanthin mit dem Molybdopterin Cofaktor des Enzyms. Dabei inhibiert die Substanz sowohl die oxidierte als auch die reduzierte Form des Enzyms. Die Bindung von Febuxostat ist strukturbasiert. Somit wird die Entstehung von Harnsäure zum einen und die Bildung von freien Radikalen zum anderen verhindert. Febuxostat inhibiert keine weiteren Enzyme des Purin- oder des Pyrimidinstoffwechsels.

Febuxostat wird oral appliziert. Nach 1,5h ist die maximale Plasmakonzentration erreicht. Die einmalige Gabe der Substanz am Tag ist für einen konstanten Wirkspiegel ausreichend.

Febuxostat wird primär für die Behandlung der chronischen Gicht verwendet, weitere Krankheitsbilder, in denen Febuxostat zum Einsatz kommt, sind das Tumorlyse-Syndrom und die Polycythaemia vera. Beide Erkrankungen gehen mit erhöhter Harnsäurebildung einher (Wittkopper et al., 2011).

3.8 Grundlagen der Anatomie und Physiologie der Milz

Die Milz ist ein retikuloendotheliales Organ, das beim Menschen im linken Oberbauch liegt und im physiologischen Zustand durch die 9.-11. Rippe bedeckt wird. Arteriell wird die Milz durch die Arteria lienalis versorgt, die dem Truncus coeliacus entspringt. Der venöse Abfluss verläuft über die Vena lienalis, die in die Vena mesenterica superior mündet.

Zusammenfassend können der Milz vier Hauptfunktionen zugeschrieben werden.

1. Filtration: Die Milz filtriert und baut alte oder abnorme Erythrozyten, Antigene von beispielsweise Mikroorganismen oder Antigen-Antikörperkomplexen ab.
2. Immunologische Aufgaben: Als immunologisches Organ findet in der Milz die Produktion von Antikörper und Zytokinen und die Aktivierung von Makrophagen statt.
3. Reservoir Funktionen: Ein Drittel aller Thrombozyten sowie eine große Menge an Granulozyten werden in der Milz gespeichert
4. Hämatopoese: Die Milz hat primär in der Fetalperiode hämatopoetische Aufgaben. Im Verlauf der Entwicklung verliert die Milz diese Funktion (Lefor und Phillips, 2008) (Beauchamp et al., 2004).

Darüber hinaus fungiert die Milz als Lymphozytenpool in dem sich große Mengen an austauschbaren B- Lymphozyten und bis zu 30% aller austauschbaren T- Lymphozyten befinden (Christensen et al., 1978).

3.9 Splenektomie

In der Klinik wird eine Splenektomie bei hämatoonkologischen Krankheitsbildern oder Milzrupturen durchgeführt. Dabei kann die Milz laparoskopisch oder über eine Laparotomie entfernt werden. Zuerst wird die Gefäßversorgung ligiert und dann die ligamentären Verbindungen getrennt, sodass die Milz entnommen werden kann (Lefor und Phillips, 2008). Studien der vergangenen Jahre deuten darauf hin, dass eine simultan zur Leberresektion durchgeführte Splenektomie die Sicherheit dieser Operationen erhöht und mit einer reduzierten Mortalität einhergeht (Glanemann et al., 2005; Sugawara et al., 2000). Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Milzresektion die Gesamtproduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ im Körper senkt (Crandall et al., 2009). Ebenfalls wurde dargelegt, dass die Splenektomie in einigen ALI Modellen zu einer verminderten Anzahl an neutrophilen Granulozyten, sowie einer Reduktion von ROS und Zytokinen im Lungengewebe führt (Savas et al., 2003). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass es durch eine Splenektomie zu einem Anstieg der postoperativen Komplikationsrate bei chirurgischen Eingriffen nach Milzresektion kommt (Eaton et al., 2000). Insbesondere die Lunge reagiert nach Splenektomie sensibler auf

Krankheitsprozesse (Neumann et al., 2002) und weist erhöhte postoperative Komplikationen auf (Dagbert et al., 2016). Ob eine simultan zur ausgedehnten Leberresektion durchgeführte Milzresektion protektiv auf die Lunge wirkt und welche Prozesse dabei eine Rolle spielen, ist noch nicht endgültig geklärt.

4. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es die Leukozytenzahl sowie mikrohämodynamischen Parameter in Lungengefäßen zu erfassen, nachdem eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde. Folgende Fragestellungen sollten dabei geklärt werden:

- I. Führt die ausgedehnte Leberresektion zu Veränderungen der Mikrohämodynamik sowie der Leukozytenadhärenz in den Arteriolen, Venolen und Kapillarfeldern der Lunge?
- II. Bewirkt eine Inhibition der XOD mittels Febuxostat einen protektiven Effekt mit reduzierter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrozirkulation?
- III. Bewirkt die simultane Splenektomie einen protektiven Effekt mit reduzierter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrozirkulation?

5. Material und Methoden

5.1 Versuchstiere

Für sämtliche Untersuchungen wurden C57BL/6 Mäuse (Abbildung (Abb.) 3) mit einem Körpergewicht von 20-25g verwendet. Alle Mäuse entstammten aus der hauseigenen Inzucht des Instituts für klinisch- experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Alle Tiere hatten bis zum Zeitpunkt der Operation freien Zugang zu Standard-Laborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden in einzelnen Käfigen gehalten. Diese befanden sich bis zu Beginn der Experimente in einem bei 22° C klimatisierten Raum. Alle Tiere waren einem 12h Tag-/Nachtrhythmus ausgesetzt. Das Landesamt für Verbraucherschutz genehmigte die durchgeführten Versuche gemäß des Tierschutzgesetzes.

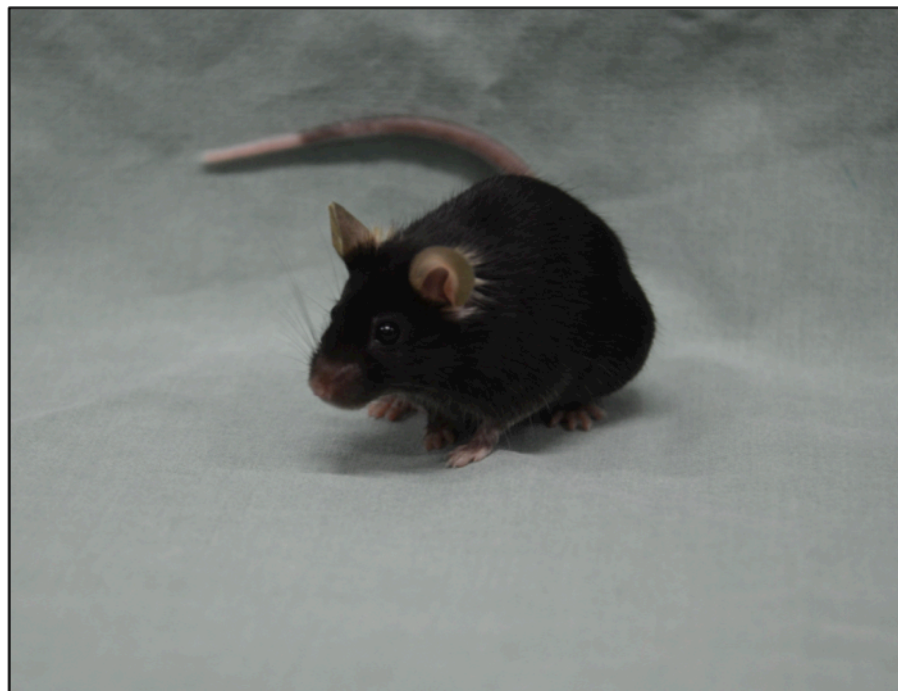


Abbildung 3: C57BL/6 Maus vor Versuchsdurchführung.

5.2 Modell

5.2.1 Operative Modelle

Vor jedem Eingriff wurde das zu untersuchende Tier mit 75mg Ketamin-Hydrochlorid pro Kilogramm Körpergewicht und 15mg Xylazinhydrochlorid pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal anästhesiert. Nach der Anästhesie wurde die Maus an Thorax oder Abdomen rasiert und mit alkoholischem Hautantiseptikum desinfiziert. Um die physiologische Körpertemperatur der Maus aufrecht zu halten, wurde das Tier unter eine Infrarotlampe positioniert.

5.2.1.1 Sham Operation

Für die Sham Operation wurde die Bauchdecke ca. 2cm eröffnet und die Leber mobilisiert. Anschließend erfolgte ein schichtgerechter Verschluss der Bauchdecke. Daraufhin wurden 1ml 0,9% Kochsalzlösung subkutan injiziert. Dadurch wurden intraoperative Volumenverluste, die durch Evaporation entstanden, ausgeglichen. Das Tier wurde für die Aufwachphase unter eine Wärmelampe gestellt.

5.2.1.2 Leberresektion

Die Leber der Maus besteht aus sieben Lappen. Eine ausgedehnte, das heißt 68%, Leberresektion erfolgte durch Entfernung des Lobus medialis dexter, des Lobus lateralis sinister und des Lobus medialis sinister (Greene und Puder, 2003). Hierfür wurden die Leberlappen von ihren ligamentären Aufhängungen mobilisiert und die vaskulären Pedikel mit einer Ligatur mit einem sterilen Haltefaden verschlossen (Abb. 4). Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, die zu- und abführenden Gefäße der verbleibenden Lappen nicht einzuengen. Anschließend wurde das Lebergewebe distal der Ligaturen reseziert. Es folgte ein schichtgerechter Verschluss der Bauchdecke. Daraufhin wurden 1ml 0,9% Kochsalzlösung subkutan injiziert. Dadurch wurden intraoperative Volumenverluste, die durch Evaporation entstanden, ausgeglichen. Das Tier wurde für die Aufwachphase unter eine Wärmelampe gestellt.

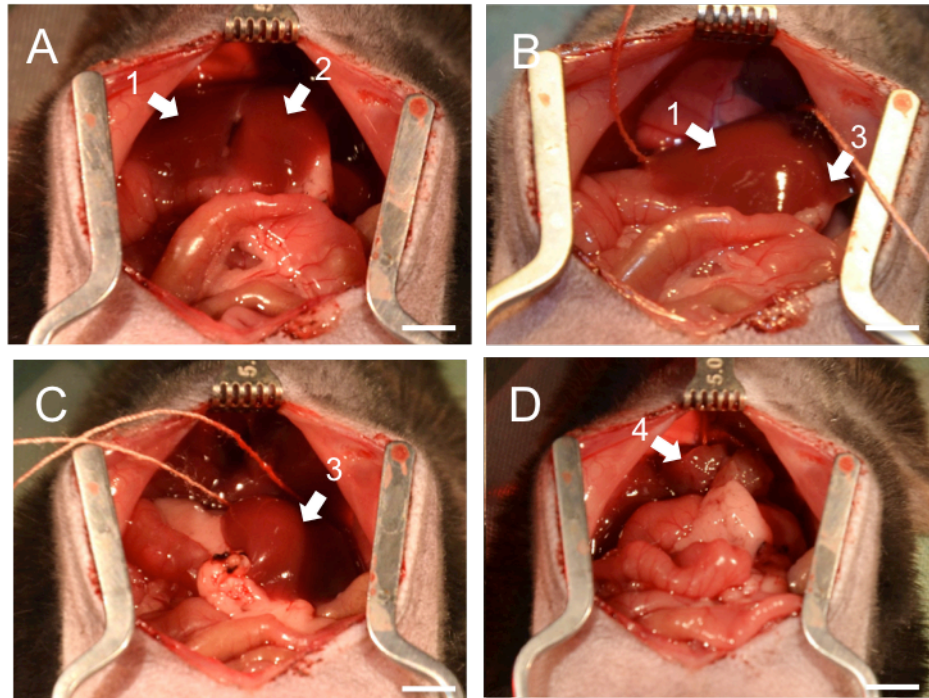


Abbildung 4: (A-C) Darstellung der Leberlappen (Pfeil 1=Lobus medialis dexter, Pfeil 2=Lobus medialis sinister und Pfeil 3=Lobus lateralis sinister). (D) Darstellung des Leberstumpfes (Pfeil 4) nach ausgedehnter Leberresektion. Maßstab: 5mm.

5.2.1.3 Splenektomie

Um den Einfluss einer Splenektomie auf die Leukozytenrekretierung in der pulmonalen Mikrozirkulation nach ausgedehnter Leberresektion zu untersuchen, wurde bei einigen Tieren simultan zur Leberresektion eine Splenektomie durchgeführt. Hierzu wurden die zu- und abführenden Gefäße der Milz mit einem sterilen Haltefaden ligiert und durchtrennt. Jeder Splenektomie folgte sofort die oben beschriebene Leberresektion.

5.2.2 Mikrozirkulationsmodell der Lunge

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Lunge erfolgt vor Präparation der Lunge die Tracheotomie und invasive Beatmung des Versuchstieres. Um die Maus zu tracheotomieren, wurde eine mediane Hautinzision über eine Strecke von ca. 1,5-2cm im Bereich des Halses durchgeführt. Es folgte die Darstellung der Trachea. Die nun freigelegte Trachea wurde oberhalb einer Knorpelspange quer inzidiert. Die Trachealkanüle wurde in die Trachea eingeführt (Abb 5).

Das Tier wurde mit einem Atemzugsvolumen von 150 μ l und einer Atemfrequenz von 100-150/min beatmet (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Germany).

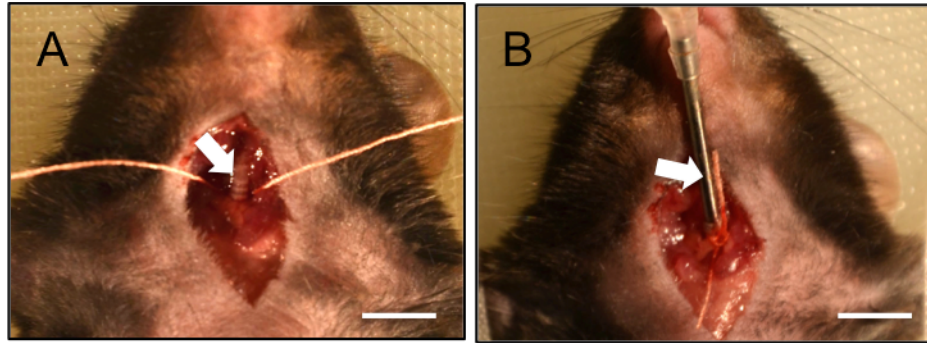


Abbildung 5: Operationsschritte zur Intubation. (A) Darstellung und Anschlingung der Trachea (Pfeil) (B) Intratracheale Positionierung der Kanüle (Pfeil). Maßstäbe: 10 mm.

Zur Darstellung der Lunge erfolgte die mediane Oberbauchlaparotomie. Nach Darstellung des Zwerchfells erfolgte die Induktion eines Pneumothorax durch Inzision des Zwerchfells. Es folgte eine breitere Eröffnung des Zwerchfells. Durch Veröden der Arteria thoracica interna konnte ein rechtsparasternaler Schnitt bis auf Höhe des vierten Intercostalraum durchgeführt werden. Mit Hilfe von Klemmen wurden die Thoraxwände lateralisiert. Um das Lungengewebe vor Austrocknung zu bewahren, wurde es intermittierend mit 0,9%NaCl Lösung beträufelt. Durch Lagerung der Maus in Linksseitenlage konnte der zu mikroskopierende rechte Oberlappen dargestellt werden. Ein großes Augenmerk wurde während der ganzen Operation darauf gelegt, das Lungengewebe nie direkt zu berühren. Das Deckglas für die Mikroskopie wurde mit einem Mikromanipulator druckfrei an die Oberfläche des rechten Oberlappens angelegt. Hierdurch konnten Bewegungsartefakte reduziert und ein Austrocknen des zu mikroskopierenden Lungenparenchyms verhindert werden (Abb. 6).

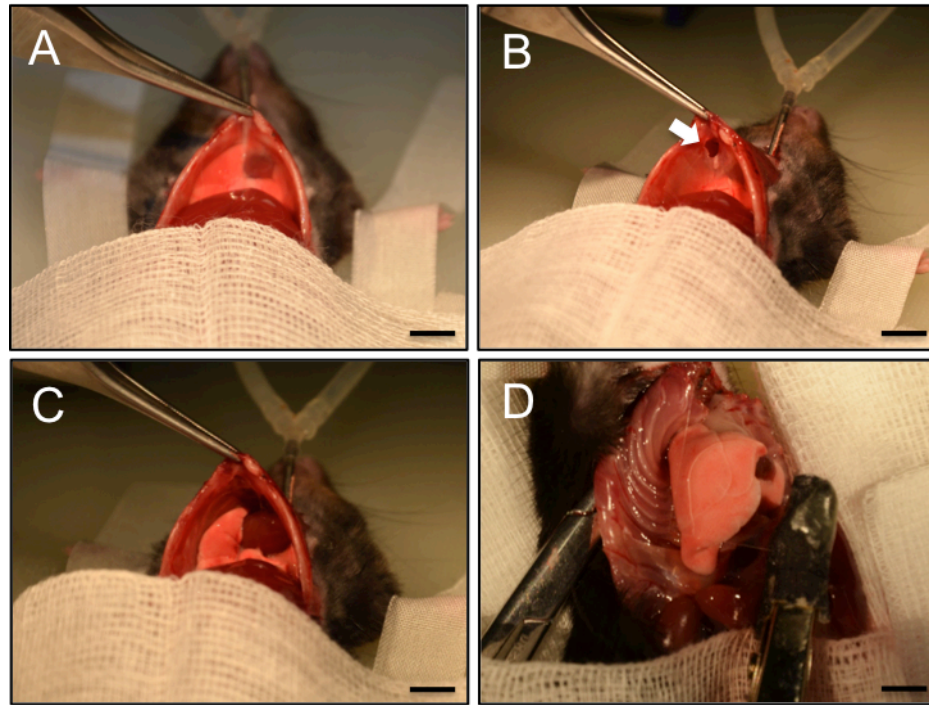


Abbildung 6: Thorakotomie der Maus. (A) Das Zwerchfell wird dargestellt. (B) Das Zwerchfell wird inzidiert (Pfeil). (C) Dargestellt ist der Thorax mit breit inzidiertem Zwerchfell. (D) Nach rechtsparasternaler Inzision wird die Lunge dargestellt. Ein Mikromanipulator hält ein Deckglas, um das Lungengewebe mikroskopieren zu können. Maßstäbe: 5 mm.

5.3 Mikroskopische Analyse

Zur Erfassung der mikrovaskulären Parameter der Versuchstiere wurden bis zu fünf randomisiert ausgewählte Arteriolen, Venolen und Kapillarfelder verwendet.

5.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Methode der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, am lebenden Tier Rhodamin 6G-markierte Leukozyten in der Mikrozirkulation zu visualisieren. Ferner besteht die Möglichkeit, mikrohämodynamische Parameter wie Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit durch das Anfärben des Blutplasmas mit FITC-Dextran zu erfassen. Zur Anfärbung der Leukozyten wurden dem Versuchstier 0,05ml 0,1% Rhodamin 6G (Molekulargewicht 479D; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) und zur Färbung des Plasmas 0,05ml 5% Fluoreszein-Isothiozyanat-Dextran (FITC) (Molekulargewicht 150kD; Fluka

Biochemika, Ulm, Deutschland) retrobulbär verabreicht.

Sofort nach Präparation der Lunge wurde das Tier intravital mikroskopiert. Zur intravitalen Mikroskopie wurde eine Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss HBO 100, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100W Quecksilberlampe verwendet. Das Sichtfeld kann mit zuschaltbaren Filterblöcken mit blauem (450nm Wellenlänge) und grünem (530nm Wellenlänge) Licht ausgeleuchtet werden. Der emittierte Lichtstrahl wurde auf >520 nm (blau) und >580nm (grün) gefiltert (Abb.7).

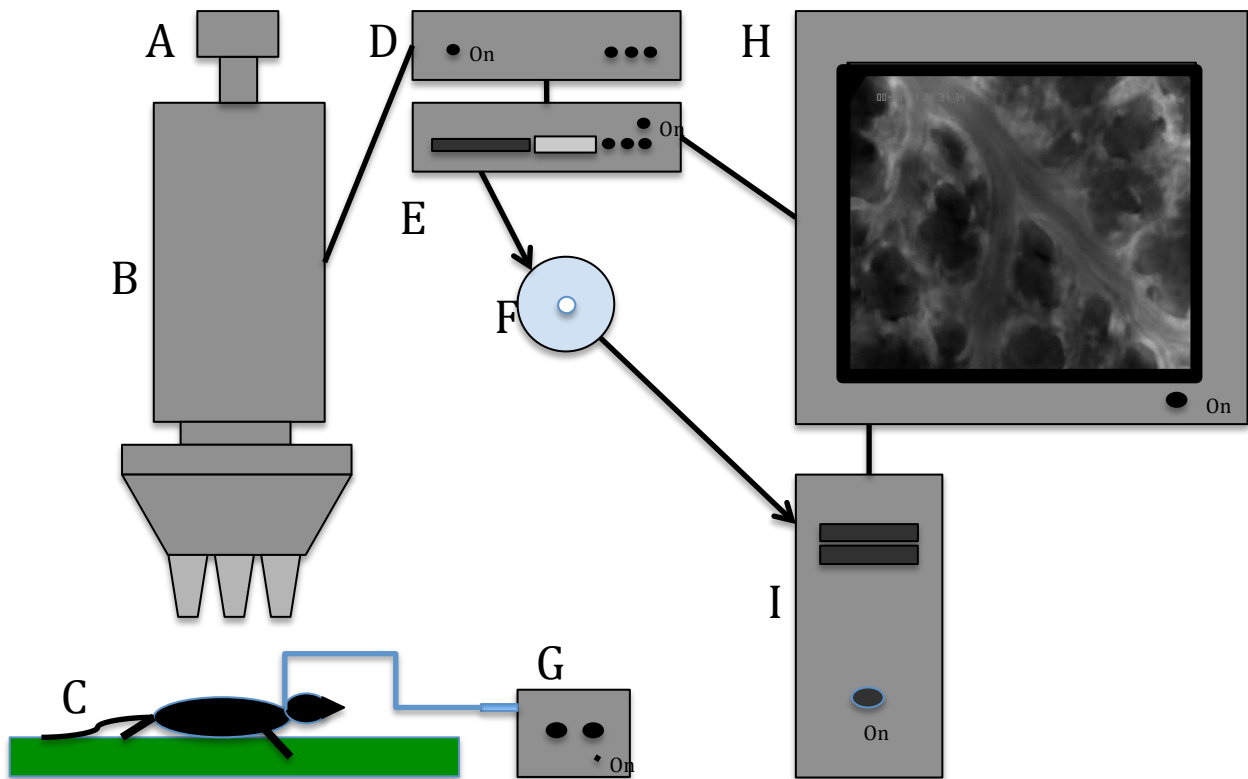


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung eines intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes. Die tracheotomierte und beatmete C57BL/6 Maus (C) wurde über ein Beatmungsgerät (G) beatmet und die präparierte Lunge wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (B) positioniert. Vom Mikroskop erfolgte die Bildübertragung durch eine CCD-Kamera (A) über einen Videotimer (D) an den Monitor (H) und das Aufnahmegerät (E). Die Auswertung des aufgenommenen Datenträgers (F) wurde später mit Hilfe des Computer-assistierte Analysesystems CapImage (I) off-line durchgeführt.

Über eine „Charge coupled device“ (CCD) Videokamera (FK-6990-IQ-S, Pieper; Schwerte Deutschland), die an einen DVD-Rekorder (R121 Samsung Group, Soul, Südkorea)

angeschlossen war, wurden die mikroskopischen Bilder aufgenommen. Eine Vergrößerung des Objektes von x1150 wurde durch ein 50x Objektivs (numerische Apertur = 0,55) auf einem 14 Zoll Monitor (KV-14CT1E, Trinitron, Sony, Tokio, Japan) erreicht. Ein zwischen Kamera und Aufnahmegerät geschalteter Videotimer (VGT 33; FOR-A Company Ltd., Japan) ermöglichte die Dokumentation von Versuchstiernummer und Zeit nach Beginn der Mikroskopie.

5.4.1 Mikrovaskuläre Parameter

Die auf DVD aufgenommenen Bilder der intravitalen Mikroskopie wurden zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet. Die Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter wurde mit Hilfe eines Computer-assistierte Bildanalyseprogramms, CapImage (Zeintl, Heidelberg, Germany), durchgeführt. Die Untersuchungszeit kann durch diese Methode verkürzt werden, was eine geringere Belastung des Tieres zur Folge hat. Zur Erfassung der mikrovaskulären Parameter der Versuchstiere wurden bis zu fünf randomisiert ausgewählte Arteriolen, Venolen und Kapillarfelder analysiert.

5.4.1.1 Gefäßdurchmesser

Durch die FITC-Dextran-Färbung konnten die exakten Gefäßgrenzen dargestellt werden. Die Analyse des Gefäßdurchmessers erfolgte senkrecht zur Gefäßinnenwand durch Markierung der Randpunkte des Gefäßes. Die Strecke wurde in μm gemessen. Pro Gefäß wurden fünf Strecken gemessen und der Mittelwert ermittelt.

5.4.1.2 Blutzellgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde im Zentralstrom des Gefäßes mit Hilfe der Computerassistierte Line-Shift-Methode durchgeführt (Klyscz et al., 1997). Um die Blutzellgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde zentral in das Gefäß eine Messlinie eingezeichnet, die der Flussrichtung des Blutstromes folgte (Abb. 8). Die DVD wurde für zehn Sekunden in Echtzeit abgespielt. Das gefärbte Plasma, das entlang dieser Linie floss, wurde für jedes Halbbild durch ein Computerprogramm in Grauwertprofile überführt. Der Computer bildete aus den

Grauwertprofilen ein Line-Shift-Diagramm. Die Grauwertprofile wurden vom PC gespeichert und über die Zeit aneinander gereiht. Zu erkennen waren in dem Line-Shift-Diagramm helle Linien, wenn Plasma, und dunkle Linien, wenn Erythrozyten entlang der Linie flossen (Abb. 8).

Durch Nachzeichnen der Linien in diesem Line-Shift-Diagramm konnte das Programm die Steigung der Linien ermitteln. Aus der Steigung dieser Linien wurde die Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) errechnet.

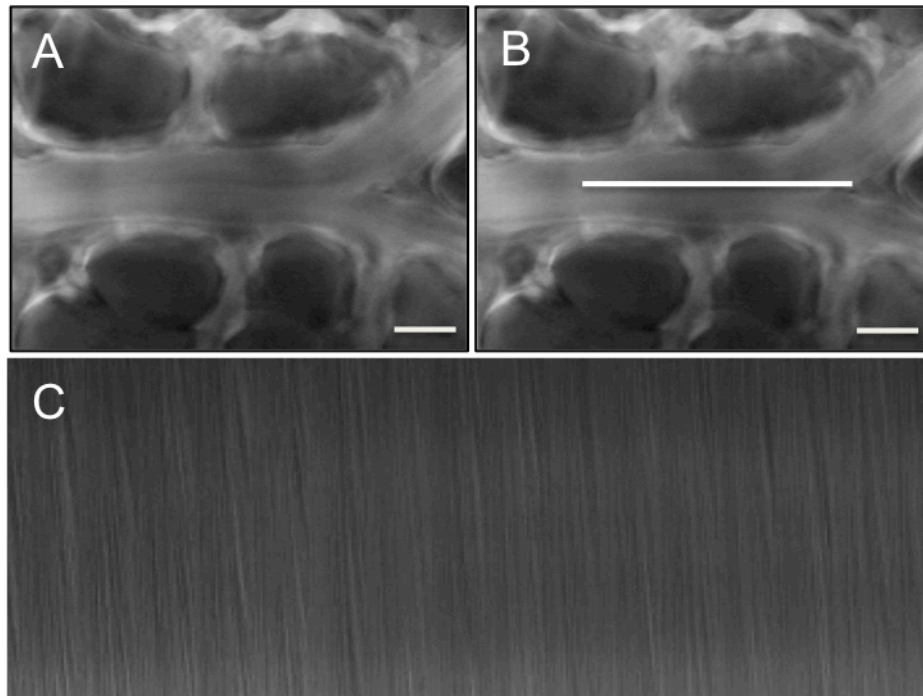


Abbildung 8: (A) Lungengefäß in 1150-facher Vergrößerung. (B) Messlinie im Zentrum des Blutgefäßes zur Messung der Blutzellgeschwindigkeit. (C) Durch Berechnung der Steigung der Linien im Line-Shift-Diagramm kann die Blutzellgeschwindigkeit berechnet werden. Maßstäbe $40\mu\text{m}$.

5.4.1.3 Blutvolumenfluss

Der Blutvolumenfluss (V) berechnet sich durch Multiplikation der Blutzellgeschwindigkeit mit dem Querschnitt des jeweiligen Gefäßes. Dabei muss nach Baker und Wayland beachtet werden, dass in röhrenförmigen Gebilden die Flussgeschwindigkeit nicht Newton'scher Flüssigkeiten, wie Blut, im Randbereich geringer als im Zentrum ist (Baker und Wayland, 1974). Zentral wird somit die Flussgeschwindigkeit als zu hoch bewertet, wohingegen im Randbereich die Geschwindigkeit der Flüssigkeit als zu niedrig geschätzt wird. Da die Messlinie der Line-Shift-

Methode im Zentrum liegt, wird somit die Blutzellgeschwindigkeit im Gefäß überschätzt. Um diesen Fehler zu verbessern wird der Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor (1,6) verwendet.

$$\text{Blutvolumenfluss } V = \pi \times (d/2)^2 \times v/K$$

d =Gefäßdurchmesser; v =Blutzellgeschwindigkeit; K =Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor

5.4.1.4 Scherrate

Die Scherrate ist ein Maß für die Kraft, die durch den Blutfluss auf die Gefäßwand wirkt. Mit der von Newton hergeleiteten Formel wird die Scherrate Y folgendermaßen berechnet.

$$\text{Scherrate } Y = 8 \times v/d$$

Y =Scherrate; v = Blutzellgeschwindigkeit; d =Gefäßdurchmesser

5.4.1.5 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Bei Auswertung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion werden entsprechend ihrer Interaktion mit dem Gefäßendothel einerseits rollende Leukozyten, andererseits adhärenente Leukozyten gezählt. Rollende Leukozyten binden nur kurzzeitig an das Gefäßendothel und werden dann mit dem Blutstrom weitergetragen. Als rollende Leukozyten wurden diejenigen angesehen, die mit weniger als 2/5 der zentralen Blutzellgeschwindigkeit am Endothel entlang rollten. Die Anzahl rollender Leukozyten an einem bestimmten Referenzpunkt innerhalb des Gefäßes wurde als rollende Leukozyten/Minute (n/min) angegeben. Adhärenente Leukozyten wurden als solche gezählt, die sich in einem 100µm langen Abschnitt für 20 Sekunden nicht bewegten. Die Anzahl adhärenenter Leukozyten wurde pro Fläche Gefäßendothel (mm²) berechnet. Dabei wurde vorausgesetzt, dass ein Blutgefäß eine zylindrische Gefäßgeometrie hat. Somit ergab sich die Zahl adhärenenter Leukozyten pro Gefäßendothelfläche aus folgender Formel:

$$\text{Leukozyten/mm}^2 = n/\pi \times d \times 100 \times 10^{-6}$$

n =Anzahl von Leukozyten; d =Gefäßdurchmesser

5.4.1.6 Funktionelle Kapillardichte

Um die funktionelle Kapillardichte zu berechnen wurde randomisiert ein Gesichtsfeld ausgewählt (Abb. 9). Innerhalb dieses Gesichtsfelds wurde die Länge der perfundierten Kapillaren ins Verhältnis zur Gewebefläche gesetzt. Somit wurde die funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 angegeben.

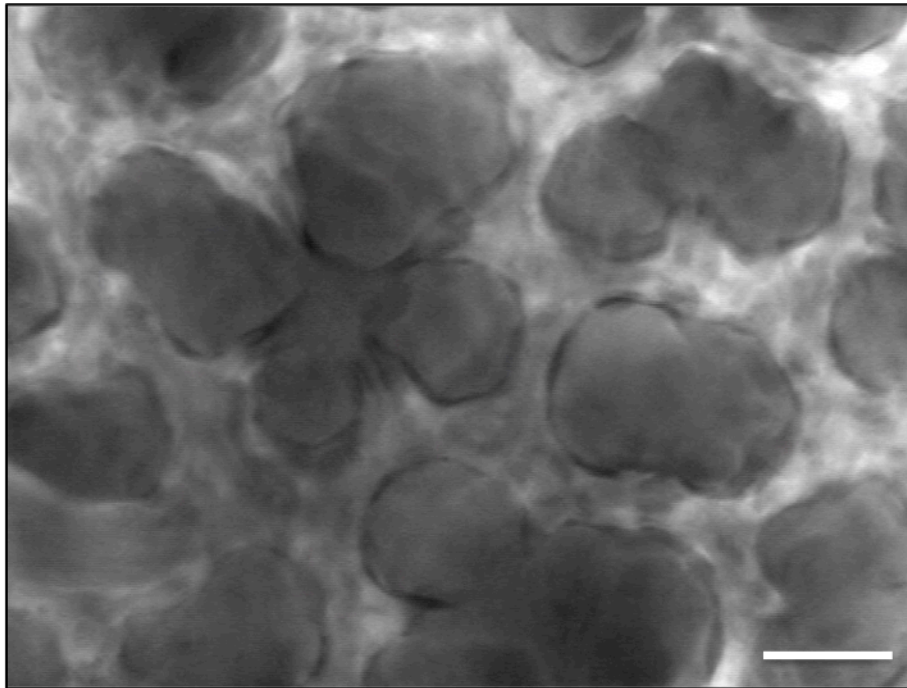


Abbildung 9: Gesichtsfeld einer 1150-fachen Vergrößerung eines Kapillarfeldes. Maßstab $40\mu\text{m}$.

5.4.1.7 Leukozyten im Kapillarfeld

Die Anzahl der Leukozyten in den Kapillarfeldern wurden in Regions of Interest (ROI) ausgewertet. Die Anzahl der Leukozyten wurde pro Gewebefläche der ROI angegeben, das heißt in Leukozyten pro mm^2 .

5.5 Wet-to-Dry Weight Ratio

Mit dem Wet-to-Dry Weight Ratio wird untersucht, ob in der Lunge ein Ödem entsteht. Dabei wurde der rechte Oberlappen der Lunge sofort nach Beendigung der IVM entnommen, auf Blottingpapier überschüssige Flüssigkeit abgetropft und das Gewicht gemessen. Daraufhin wurde das Lungengewebe für 72 Stunden bei 65° C in einem Brutschrank getrocknet. Nach Trocknung wurde das Lungengewebe erneut gewogen. Das Gewicht des frisch entnommenen Lungengewebes wurde mit dem Gewicht des getrockneten Lungengewebes ins Verhältnis gesetzt.

5.6 Histologie

Für histologische Untersuchungen wurde den Tieren sofort nach Beendigung der Mikroskopie Lungengewebe entnommen. Dabei wurde standardisiert der linke Oberlappen der Lunge der Maus vorsichtig vom Lungenhilus getrennt und sofort in 4% Formaldehydlösung fixiert. Nach 24 Stunden wurde das Präparat in Paraffin eingebettet.

5.6.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem spezifischen Nachweis von bestimmten Proteinen im Gewebe. Mit Hilfe der Antigen-Antikörperreaktion werden die Proteine im histologischen Schnitt für die lichtmikroskopische Untersuchung sichtbar gemacht.

5.6.1.1 Aktivierte cleaved Caspase-3 und Myeloperoxidase Färbung

Die immunhistochemische Quantifizierung von aktivierten Caspase-3-positiven Zellen im Lungenparenchym dient zum Nachweis von apoptotischen Zellen. Die enzymatische Spaltung (to cleave = spalten) der Procaspase-3 zur Caspase-3 führt zu einer Aktivierung des Enzyms und damit zu einer Initiierung der Apoptose. In der vorliegenden Arbeit wurde die gespaltene, das heißt die aktivierte Form der Caspase-3 nachgewiesen. Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das unter anderem in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen vorkommt.

Zuerst wurden die Paraffinschnitte durch 3x3 minütige Behandlung mit Xylol, sowie Rehydratation durch absteigende Alkoholreihe, das heißt von absolutem bis 70% Ethanol, entparaffiniert. Nach Spülung mit Aqua Destilata (A. dest.) wurden die Präparate zur Epitopdemaskierung wie folgt angedaut:

Die Schnitte für die aktivierte Caspase-3 Färbung wurden in 200ml Citratpuffer pH 6,0 bei 700W in einer Mikrowelle für 10 Minuten gekocht. Um die Austrocknung der Schnitte zu vermeiden, wurde die Küvette zwischendurch und nach dem Kochen mit A. dest. aufgefüllt. Eine Abkühlung der Präparate bei Raumtemperatur folgte. Der Ablauf war für die MPO identisch, nur wurde anstelle des Citratpuffers ein EDTA-Puffer mit einem pH Wert von 9,0 verwendet. Der Abkühlung der Präparate folgte eine erneute Spülung mit A. dest. und, um endogene Peroxidasen im Gewebe zu blockieren, wurden die Schnitte für 10 Minuten in 3% H₂O₂ (in Methanol verdünnt) eingelegt. Als Blockierungsreagenz wurde eine Mischung aus 1ml PBS (phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Salzlösung) und 30µl Ziegen-Normalserum verwendet. Nachdem auf das Präparat 50µl pipettiert wurde, folgte die Inkubation für 30 Minuten in einer feuchten Kammer. Daraufhin wurde erst ein Avidin-Blockierungsreagenz aufgetragen und für 15 Minuten inkubiert. Eine Spülung mit PBS folgte. Dann wurde das Biotin-Blockierungsreagenz aufgetragen, für 15 Minuten inkubiert und ebenfalls mit PBS gespült. Dieser Schritt sollte Avidin und Biotin, das möglicherweise im Gewebe vorkommt, blockieren. Es folgte die Applikation des aktivierten Caspase-3 Antikörpers (Verdünnung: 1:100) (New England Biolabs, Frankfurt) sowie des MPO Antikörpers (Verdünnung: 1:500) (Abcam, Milton, UK). Nach dem Auflegen eines Deckglases wurden die Präparate in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte drei Minuten in PBS gespült und nach Entfernen des Puffers erneut für fünf Minuten gespült.

Folgend wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Als Sekundärantikörper diente ein biotinmarkierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (Abcam, Milton, UK). Die Schnitte wurden 40 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin für drei Minuten mit PBS gespült. Eine erneute fünf-minütige Spülung folgte der Entfernung des Puffers. Streptavidin-Peroxidase wurde 1:50 in PBS verdünnt, aufgetragen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Spülung mit PBS folgte. Als Chromogen diente Diaminobenzidin (DAB). DAB wurde angesetzt indem 1ml A. dest. mit je einer Tablette DAB

und H₂O₂ gemischt wurden. 100µl dieser Mischung wurden aufgetragen und zwei Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Eine fünf minütige Spülung mit A. dest. folgte. Zur Gegenfärbung diente Hämalaun nach Meyer. Nach Spülung mit A. dest. wurden die Schnitte mit fließendem Leitungswasser für acht Minuten gefärbt. Eine erneute Spülung mit A. dest. folgte. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (von 70% bis absolutem Ethanol) je drei Minuten wurde das Präparat entwässert. Eine 3x3 minütige Behandlung mit Xylol und einem Auflegen eines Deckglases stellte den Abschluss der histologischen Färbung dar.

5.6.1.2 Auswertung der Histologie

Die histologischen Präparate wurden lichtmikroskopisch (Olympus BX 60, Tokio, Japan) ausgewertet. Jeder histologische Schnitt wurde bei 1150-facher Vergrößerung mäanderförmig abgefahren. Pro Schnitt wurden 25 randomisiert ausgewählte Gesichtsfelder ausgewertet. Die im Präparat positiv gefärbten Zellen wurden zur Gesamtzahl der Zellen im Gesichtsfeld ins Verhältnis gesetzt.

5.7 Western Blot

Mittels Western Blot Analyse wurde die Expression der MPO, der XOD und der XDH sowie der aktivierten Caspase-3 im Lungengewebe analysiert.

Sofort nach intravitaler Fluoreszenzmikroskopie wurde dem Tier der rechte untere Lungenlappen entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Um die Zielproteine zu extrahieren, wurde das Lungengewebe zuerst mechanisch zerkleinert. Um dem enzymatischen Abbau der Zielproteine entgegen zu wirken, wurden dem Extraktionspuffer daher verschiedene Enzym-Inhibitoren zugegeben. Die Proben wurden je nach Probevolumen mit 100-150µl Lysispuffer (10mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), pH7,5; 100mM NaCl; 0,1mM EDTA; 0,5 % Triton X 100; 0,02% NaN₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland)), einem Proteinaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), einem Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (1:100; Sigma-Aldrich) und mit 100mM Phenylmethylsulfonylfluorid (1:500; PMSF, Roth) für 20 Sekunden homogenisiert. Es folgte eine

dreißigminütige Inkubation auf Eis. Daraufhin wurden die Proben für 30 Minuten mit 16000xg/min bei 4°C zentrifugiert (Biofuge Fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Teile des Überstandes wurden als Gesamtzellproteinextrakte abpipettiert und zur Probenbestimmung verwendet.

Eine gleiche Proteinkonzentration der Proben muss zum Vergleich der Ergebnisse der Elektrophorese gewährleistet sein. Um die gleiche Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen, wurde die Methode nach Lowry et al. verwendet (Lowry et al., 1951). Dabei kann die Proteinkonzentration in einer Lösung durch die Entstehung eines blauen Farbkomplexes photometrisch, und dadurch quantitativ bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde für jede Probe zweimal bestimmt und auf gleiche Proteingehalte eingestellt.

Nachdem die Proteinextrakte auf eine Konzentration von 4µg Protein/µl eingestellt wurden, versetzte man die Extrakte mit 2x „sample buffer“ nach Laemmli (4% SDS (sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat), 20% Gycin; 10% β-Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenolblau; 0,125M TRIS-HCl pH 6,8; Sigma-Aldrich). Durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DTT) werden zuerst Disulfidbrücken gespalten. Durch diese Schritte liegen die Proteine ungefaltet als Polypeptidkette vor. Die Eigenladung der Proteine wird durch die Zugabe des amphipathischen Detergens SDS (ca. 1,4g SDS/g Protein) maskiert, da sich das Detergens an die Polypeptidketten anlagert. Die entstandenen Mizellen sind negativ geladen und liegen mit konstanter Nettoladung vor. Die Extrakte wurden für fünf Minuten in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Dieser Schritt ist notwendig, um zu gewährleisten, dass die Proteine rein nach Molekulargewicht getrennt, und Störgrößen, wie Form oder Ladung der Proteine, keine Rolle spielen.

Die eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophore (SDS-PAGE / sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese) unter diskontinuierlichen Bedingung nach Laemmli wurde für die Western-Blot-Analyse verwendet (Laemmli, 1970). Beim diskontinuierlichen System werden zwei unterschiedliche Gele (ein Sammelgel und ein Trenngel) verwendet. Die beiden Gele unterscheiden sich in pH-Wert und Ionenstärke der Puffer, Porengröße sowie Art der Ionen in den Gelpuffern. Zuerst werden die Proben im Sammelgel konzentriert. Im Trenngel können die Proteine rein nach ihrem

Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Bei der Herstellung der Gele wurde eine 5% Acrylamidkonzentration für das Sammelgel und eine 8% beziehungsweise 10% Konzentration für die Trenngele verwendet.

In einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad, München, Deutschland) wurden die Proteine in einem TRIS/Glycinpuffer (0,125M TRIS Base, 0,96M Glycin, 0,5M SDS; Roth) gemäß ihrer Molekülgröße getrennt. Um die benötigte Niederspannung zu erreichen, wurde ein Netzgerät (Power Pac, BioRad) für stabilisierten Gleichstrom verwendet. Im Sammelgel wurden die Proteine mit einer Spannung von 100V konzentriert. Um das Trenngel zu passieren, wurde nach 15 Minuten die Spannung für eine Stunde auf 140V erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer genommen und in einem Transferpufferbad (Bjerrum-Schaefer-Nielson Puffer: 48mM TRIS, 39mM Glycin und 10% Methanol, pH 9,2) für das weitere Membran-Blotting eingestellt.

Beim Blotting werden die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende Membran transferiert. Hierfür wurde das Semi-Dry-Blot Verfahren verwendet. Als proteinbindende Membran wurde in der vorliegenden Arbeit eine PVDF (Polyvinyliden-difluorid)-Membran (BioRad) verwendet.

Während des horizontalen Proteintransfers wurde eine Semi-Dry Turbo Kammer (Trans-Blot Turbo; BioRad) verwendet. Nach 10-minütiger Äquilibration der PVDF-Membran im Transferpuffer konnte die PVDF-Membran und das Gel in eine Blot-Kassette zwischen fünf mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gelegt werden. Die Kassette mit dem enthaltenen Blotsandwich wurde so in der Blotkammer ausgerichtet, dass der Proteintransfer von Gel zur Membran möglich ist. Es wurde ein Gleichstrom (Anfangsstromstärke 1,3A/Gel) unter konstanter Spannung (25V) über 7 Minuten angelegt. Die nun mit Proteinen beladene Membran wurde über Nacht in einem TBS-T-Puffer (1,5mM TRIS Base pH 7,5; 1% NaCl; 0,1% Tween 20 (Roth,) in A. dest.) bei 4°C aufbewahrt.

Um die gesuchten Proteine auf der Membran zu detektieren, folgte eine spezifische Antikörperfärbung. Vor der Saturierung wurde eine dreimalige Waschung mit TBS-T durchgeführt. Unspezifische Bindungsstellen an den Proteinen wurden durch 30-minütige

Inkubation in 5% Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) und TBS-T blockiert. Die Membran wurde mit den Primärantikörpern und Sekundärantikörpern entsprechend Tabelle 3 inkubiert. Zwischen den Inkubationen mit den Antikörpern wurden drei weitere Waschschrte mit TBS-T durchgeführt.

Nach der Primär-Antikörper-Inkubation (Tabelle 3) wurde die Membran bei Raumtemperatur für 1,5h mit den konjugierenden Sekundär-Antikörpern inkubiert und fünfmal mit TBS-T gewaschen.

Daraufhin wurde durch eine einminütige Inkubation der Membran mit ECL (Enhanced chemiluminescence) Reagenz eine Chemilumineszenzreaktion durchgeführt (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland).

Ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) fing die von der Membran emittierten Lichtsignale auf. Dies ermöglichte eine Visualisierung der Stärke der Proteinexpression. Die Auswertung der Röntgenfilme fand mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc, BioRad) und dem entsprechenden Quantifizierungsprogramm (Quantity One Gel- Doc, BioRad) statt. Die Proteinexpressionsstärke konnte über die densitometrische Bestimmung der Lichtabsorption durchgeführt werden. Dabei wurde die optische Dichte der Banden über die Ausdehnungsfläche bestimmt. Als interner Standard zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung und des Proteintransfers wurde β -Actin (Sigma-Aldrich) verwendet.

Primär-Antikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung/Inkubation	Sekundär-Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung/Inkubation
MPO	Rabbit-Anti-Mouse	Abcam, Cambridge, UK	1:50 über Nacht bei 4°C und 1:300 für 4 Stunden bei Raumtemperatur	Donkey-Anti-Rabbit IgG-POD	GE, Healthcare, Freiburg, Deutschland	1:5000 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur
Cleaved-Caspase-3	Rabbit-Anti-Mouse	Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland	1:50 über Nacht bei 4°C und 1:300 für 4 Stunden bei Raumtemperatur	Donkey-Anti-Rabbit IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur
XOD	Rabbit-Anti-Mouse	Abcam	1:25 über Nacht bei 4°C und 1:300 für 4 Stunden bei Raumtemperatur	Donkey-Anti-Rabbit IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur
XDH	Rabbit-Anti-Mouse	Biozol, Eching, Deutschland	1:50 über Nacht bei 4°C und 1:300 für 4 Stunden bei Raumtemperatur	Donkey-Anti-Rabbit IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur
β -Actin	Mouse-Anti-Mouse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1:5000 für 4 Stunden bei Raumtemperatur	Sheep-Anti-Mouse IgG-POD	GE Healthcare	1:5000 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur

Tabelle 3: Primär- und Sekundär-Antikörper für Western-Blot-Analyse.

5.8 Versuchsprotokoll

5.8.1 Versuchsgruppen

Um die Fragen in der Zielsetzung der Arbeit zu beantworten wurden die Versuchstiere randomisiert in vier Gruppen unterteilt:

I.) Sham-Gruppe: Sham Operation (n=7)

II.) Resektion-Gruppe: 68% Leberresektion (n=8)

III.) Febuxostat-Gruppe: orale Medikamentenapplikation (10mg/kg KG) + 68% Leberresektion (n=8)

IV.) Splenektomie-Gruppe: Splenektomie + 68% Leberresektion (n=7)

5.8.2 Timeline

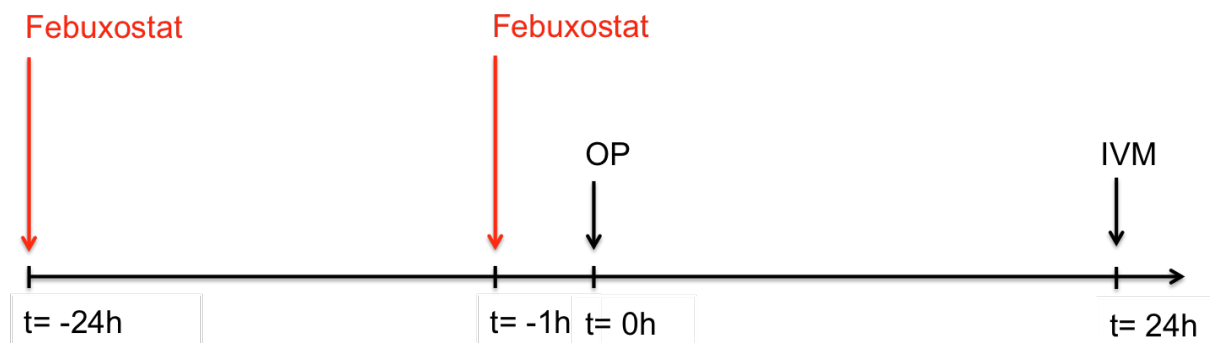


Abbildung 10: Die zeitliche Abfolge der Schritte des Versuchsaufbaus in Form einer Timeline. Applikation von 10mg/kg KG Febuxostat 24h und 1h vor Operation. Operation: Sham-Operation, 68% Leberresektion oder Milzresektion plus 68% Leberresektion. IVM 24h nach Operation.

5.9 Statistik

Die in einem Versuchstier erhobenen Messwerte wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. Neben den Mittelwerten wurde ebenfalls der Standardfehler des Mittelwertes aller Ergebnisse angegeben (Mittelwert \pm SEM). Lag eine Normalverteilung der Werte vor, wurden die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sham-Gruppe und Resektions-Gruppe beziehungsweise Resektion-Gruppe und Febuxostat-Gruppe oder Resektions-Gruppe und Splenektomie-Gruppe mittels Student's t-Test für unverbundene Werte berechnet. Wurden der Gruppenvergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt lag keine Normalverteilung der Daten vor. Für die Analysen und Berechnungen wurde das Software Packet SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet.

6. Ergebnisse

6.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

6.1.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Leukozyten-Rolling in pulmonalen Venolen

Die ausgedehnte Leberresektion führte nach 24h in pulmonalen Venolen zu einer tendenziell erhöhten Anzahl an rollenden Leukozyten im Vergleich zur Anzahl an rollenden Leukozyten in den pulmonalen Venolen Sham-operierter Tiere, wenngleich der Unterschied nicht signifikant war (Abb. 11) (Resektion-Gruppe: $2,2 \pm 0,5 \text{ min}^{-1}$ vs. Sham-Gruppe: $1,2 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$; $p > 0,05$). Die Vorbehandlung mit Febuxostat 24h vor Leberresektion zeigte keinen Einfluss auf das Leukozyten-Rolling in pulmonalen Venolen ($2,6 \pm 0,9 \text{ min}^{-1}$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe). Die simultane Splenektomie zeigte einen tendenziellen Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten in den pulmonalen Venolen nach 24h ($3,2 \pm 0,6 \text{ min}^{-1}$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe), jedoch ohne signifikante Unterschiede.

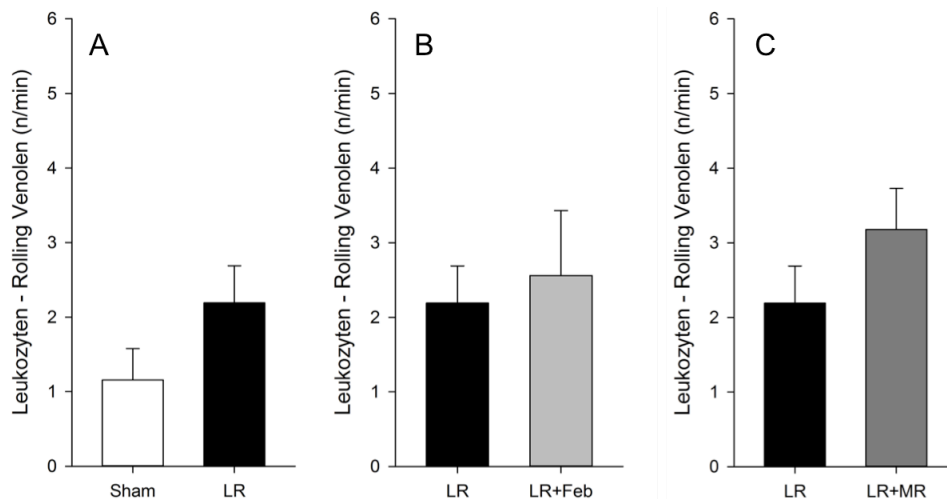


Abbildung 11: Leukozyten-Rolling in pulmonalen Venolen 24h nach Operation. (A) Die ausgedehnte Leberresektion (A, LR) führte nach 24h in pulmonalen Venolen zu einer tendenziell erhöhten Anzahl an rollenden Leukozyten im Vergleich zu der Anzahl an rollenden Leukozyten in den pulmonalen Venolen Sham-operierter Tiere (A, Sham), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. (B) Die Vorbehandlung mit Febuxostat 24h vor Leberresektion (B, LR+Feb) zeigte keinen Einfluss auf das Leukozyten-Rolling in pulmonalen Venolen im Vergleich zu pulmonalen Venolen ausschließlich leberresezierter Tiere (B, LR). (C) Die simultane Splenektomie (C, LR+MR) zeigte einen tendenziellen Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten in den pulmonalen Venolen nach 24h verglichen mit der Anzahl rollender Leukozyten in pulmonalen Venolen ausschließlich leberresezierter Tiere (C, LR), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Mittelwert \pm SEM.

Leukozyten-Rolling in pulmonalen Arteriolen

Die ausgedehnte Leberresektion führte nach 24h in pulmonalen Arteriolen zu einem tendenziellen Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten im Vergleich zur Anzahl rollender Leukozyten in pulmonalen Arteriolen Sham-operierter Tiere (Abb. 12) (Resektion-Gruppe: $3,1 \pm 0,8 \text{ min}^{-1}$ vs. Sham-Gruppe: $1,5 \pm 0,5 \text{ min}^{-1}$; $p > 0,05$), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Die Versuchstiere, die 24h präoperativ Febuxostat appliziert bekommen hatten, zeigten keinen wesentlichen Anstieg an rollenden Leukozyten in pulmonalen Arteriolen ($3,8 \pm 1,1 \text{ min}^{-1}$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe). Die simultan zur Leberresektion durchgeführte Splenektomie hatte einen diskreten Anstieg des Leukozyten-Rollings in den pulmonalen Arteriolen nach 24h zur Folge ($4,5 \pm 0,8 \text{ min}^{-1}$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe), jedoch ohne signifikanten Unterschied.

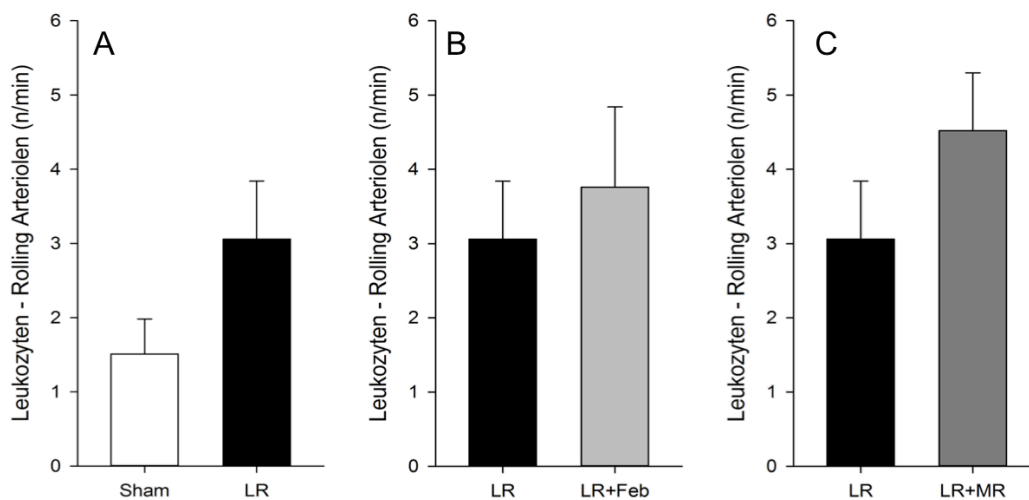


Abbildung 12: Leukozyten-Rolling in pulmonalen Arteriolen 24h nach Operation. (A). Die ausgedehnte Leberresektion (A, LR) führte nach 24h in pulmonalen Arteriolen zu einer tendenziell erhöhten Anzahl an rollenden Leukozyten im Vergleich zur Anzahl an rollenden Leukozyten in pulmonalen Arteriolen Sham-operierter Tiere (A, Sham), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. (B) Die Vorbehandlung mit Febuxostat 24h vor Leberresektion (B, LR+Feb) zeigte keinen Einfluss auf das Leukozyten-Rolling in pulmonalen Arteriolen im Vergleich zum Leukozyten-Rolling in pulmonalen Arteriolen ausschließlich leberresezierter Tiere (B, LR). (C) Die simultane Splenektomie (C, LR+MR) zeigte einen tendenziellen Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen nach 24h verglichen mit der Anzahl an rollenden Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen ausschließlich leberresezierter Tiere (C, LR), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Mittelwert \pm SEM.

Leukozyten-Adhärenz in pulmonalen Venolen

Die ausgedehnte Leberresektion führte nach 24h zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Venolen im Vergleich zur Anzahl adhärenter Leukozyten in pulmonalen Venolen Sham-operierter Tiere (Abb. 13) (Resektion-Gruppe: $463,7 \pm 60,3 \text{ mm}^{-2}$; vs. Sham-Gruppe: $226,5 \pm 45,2 \text{ mm}^{-2}$; $p < 0,05$). Die Inhibition der XOR mittels Febuxostat 24h präoperativ konnte die Leukozyten-Adhärenz in pulmonalen Venolen im Vergleich zur Leukozyten-Adhärenz in pulmonalen Venolen ausschließlich leberresezierter Tiere signifikant reduzieren (Abb.14) ($306,5 \pm 40,3 \text{ mm}^{-2}$; $p < 0,05$ vs. Resektion-Gruppe). Eine simultane Splenektomie im Rahmen der ausgedehnten Leberresektion zeigte eine tendenzielle Reduktion der Anzahl adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Venolen (Abb. 15) ($394,2 \pm 31,2 \text{ mm}^{-2}$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war.

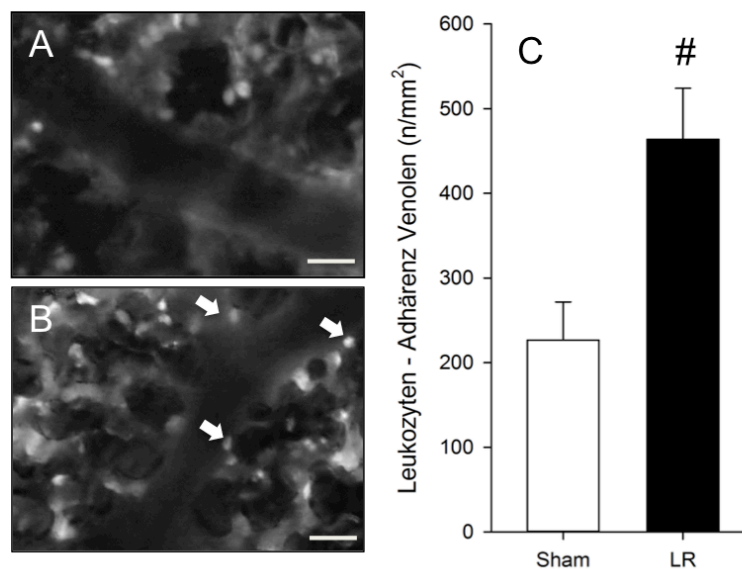


Abbildung 13: Intravitalmikroskopische Bilder adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Venolen der Sham-Gruppe (A) und der Resektion-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die Anzahl adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Venolen leberresezierter Tiere (C, LR) steigt signifikant im Vergleich zur Anzahl adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Venolen Sham-operierter Tiere (C, Sham) an. Mittelwert \pm SEM. # $p < 0,05$ vs. Sham.

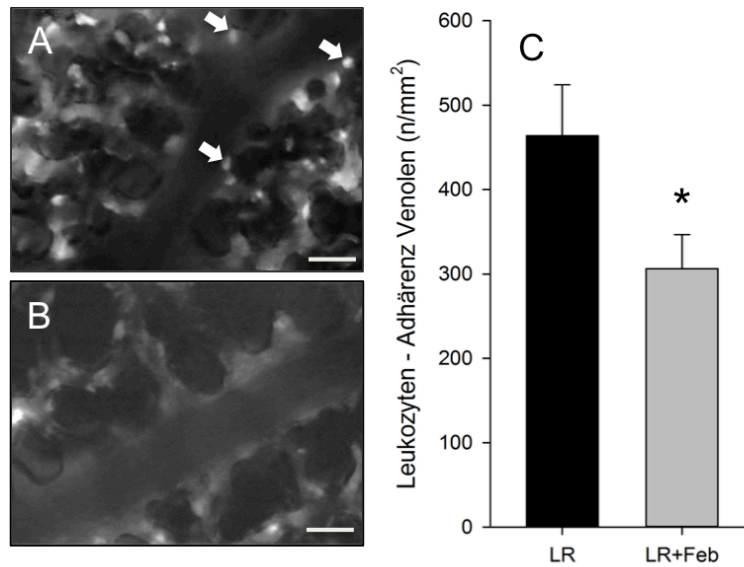


Abbildung 14: Intravitalmikroskopische Bilder adhärenz Leukozyten in den pulmonalen Venolen der Resektion-Gruppe (A) und der Febuxostat-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die Anzahl adhärenz Leukozyten in den pulmonalen Venolen der Tiere die 24h präoperativ Febuxostat verabreicht bekommen hatten (C, LR+Feb) ist signifikant niedriger als die Anzahl adhärenz Leukozyten in den pulmonalen Venolen ausschließlich leberresezierter Tiere (C, LR). Mittelwert ± SEM. * $p < 0,05$ vs. LR.

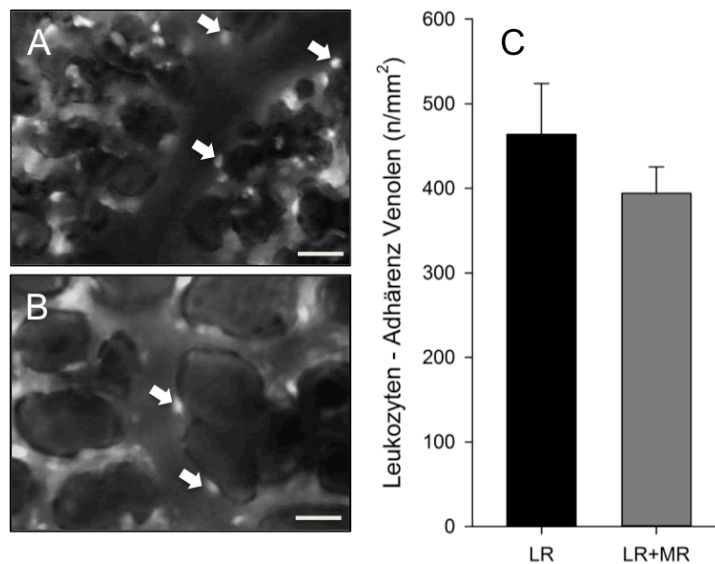


Abbildung 15: Intravitalmikroskopische Bilder adhärenz Leukozyten in den pulmonalen Venolen der Resektion-Gruppe (A) und der Splenektomie-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die Anzahl adhärenz Leukozyten in den pulmonalen Venolen der Tiere bei denen eine simultane Splenektomie durchgeführt worden war (C, LR+MR) ist verglichen mit der Anzahl an adhärenz Leukozyten in den pulmonalen Venolen ausschließlich leberresezierter Tiere (C, LR) tendenziell reduziert. Mittelwert ± SEM.

Leukozyten-Adhärenz in pulmonalen Arteriolen

Die ausgedehnte Leberresektion führte nach 24h in pulmonalen Arteriolen zu einer signifikant höheren Anzahl an adhärenenten Leukozyten im Vergleich zur Anzahl an adhärenenten Leukozyten in pulmonalen Arteriolen Sham-operierter Tiere (Abb. 16) (Resektion-Gruppe: $291,0 \pm 42,4 \text{ mm}^{-2}$ vs. Sham-Gruppe: $47,1 \pm 16,3 \text{ mm}^{-2}$; $p < 0,05$). Die orale Applikation von Febuxostat 24h vor ausgedehnter Leberresektion führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenenter Leukozyten in den Arteriolen der Lunge im Vergleich zu der Anzahl adhärenenter Leukozyten in pulmonalen Arteriolen von ausschließlich leberresezierten Tieren (Abb. 17) ($114,8 \pm 30,7 \text{ mm}^{-2}$ vs. Resektion-Gruppe; $P < 0,05$). Die simultan zur Leberresektion durchgeführte Splenektomie führte zu einer tendenziellen Reduktion der Anzahl adhärenenter Leukozyten in pulmonalen Arteriolen (Abb. 18) ($184,4 \pm 21,0 \text{ mm}^{-2}$ vs. Resektion-Gruppe vs. $p > 0,05$), wenngleich sich die Reduktion nicht signifikant zeigte.

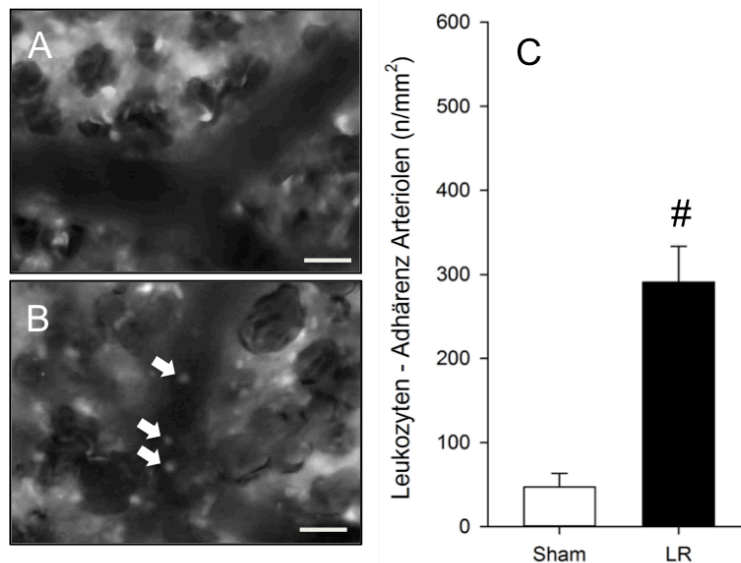


Abbildung 16: Intravitalmikroskopische Bilder adhärenenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen der Sham-Gruppe (A) und der Resektion-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die Anzahl adhärenenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen der leberresezierten Tiere (C, LR) steigt verglichen mit der Anzahl adhärenenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen Sham-operierter Tiere (C, Sham) signifikant an. Mittelwert ± SEM. # $p < 0,05$ vs. Sham.

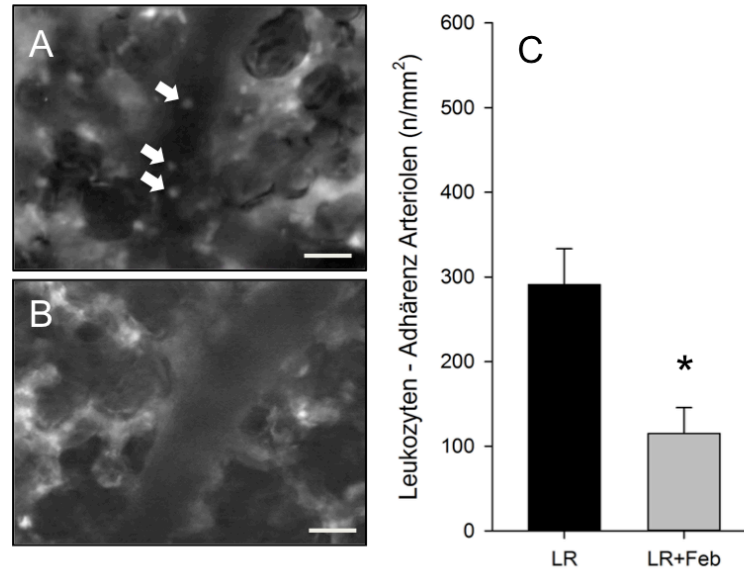


Abbildung 17: Intravitalmikroskopische Bilder adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen der Resektions-Gruppe (A) und der Febuxostat-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die Vorbehandlung mit Febuxostat 24h vor Leberresektion (C, Feb+LR) führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen verglichen mit der Anzahl adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen der Tiere, die ausschließlich einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden (C, LR). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. LR.

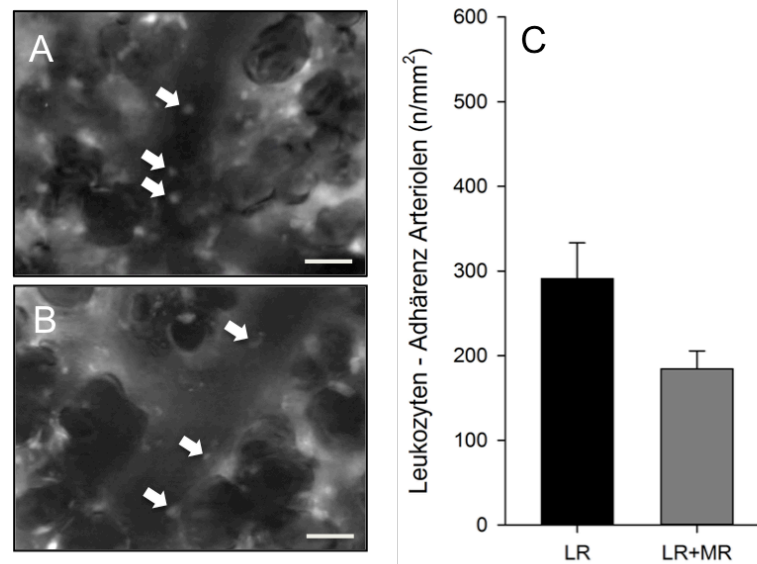


Abbildung 18: Intravitalmikroskopische Bilder adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen der Resektions-Gruppe (A) und der Splenektomie-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die im Rahmen der Leberresektion durchgeführte Milzresektion (LR+MR) zeigt einen tendenziellen Rückgang der Leukozyten-Adhärenz in pulmonalen Arteriolen im Vergleich mit pulmonalen Arteriolen der Tiere, die ausschließlich einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden (C, LR), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Mittelwert \pm SEM.

Leukozyten-Trapping im pulmonalen Kapillarfeld

Im Vergleich zu Sham-operierten Tieren führte die ausgedehnte Leberresektion zu einem signifikanten Anstieg des Leukozyten-Trappings innerhalb des Kapillarnetzwerkes der Lunge (Abb. 19) ($949,3 \pm 76,9 \text{ mm}^{-2}$ vs. Sham-Gruppe: $629,3 \pm 75,3 \text{ mm}^{-2}$; $p < 0,05$). Bei Tieren, die 24h präoperativ mit Febuxostat behandelt worden waren, zeigte sich keine Reduktion des Leukozyten-Trappings im Kapillarfeld der Lunge nach Leberresektion (Abb. 20) ($928,8 \pm 106,9 \text{ mm}^{-2}$ vs. Resektion-Gruppe; $p > 0,05$). Auch die Splenektomie zeigte keinen Einfluss auf das Leukozyten-Trapping in den pulmonalen Kapillaren (Abb. 21) ($1017,2 \pm 81,3 \text{ mm}^{-2}$ vs. Resektion-Gruppe; $p > 0,05$).

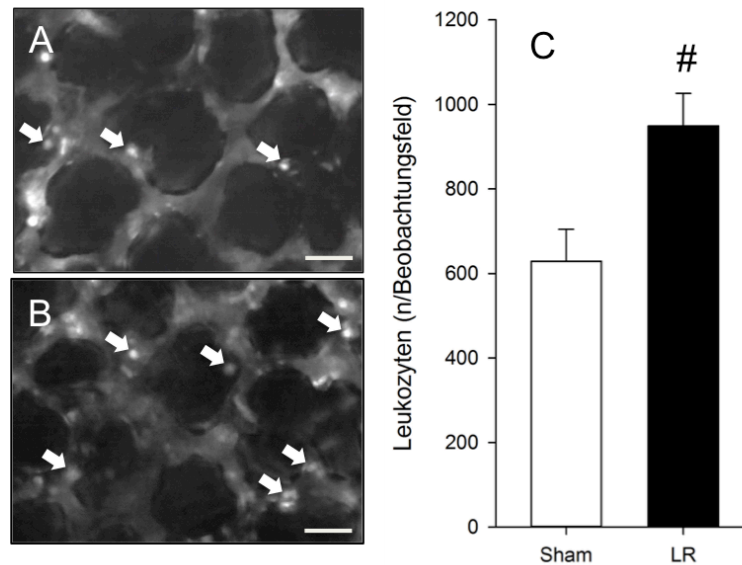


Abbildung 19: Intravitalmikroskopische Bilder des pulmonalen Leukozyten-Trapping der Sham-Gruppe (A) und der Resektions-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die ausgedehnte Leberresektion (C, LR) führte zu einem signifikanten Anstieg des pulmonalen Leukozyten-Trappings im Vergleich zum pulmonalen Leukozyten-Trapping der Tieren, die Sham-operiert wurden (C, Sham). Mittelwert ± SEM. # $p < 0,05$ vs. Sham.

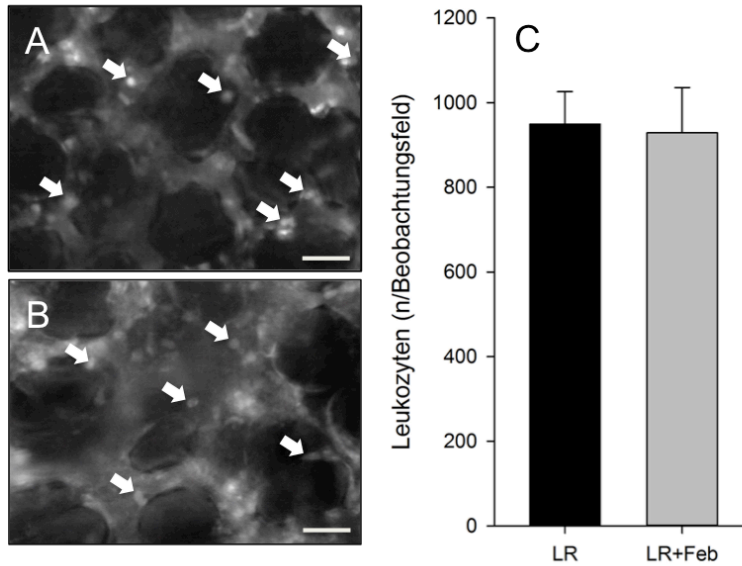


Abbildung 20: Intravitalmikroskopische Bilder des pulmonalen Leukozyten-Trapping der Resektions-Gruppe (A) und der Febuxostat-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die Vorbehandlung mit Febuxostat 24h vor Leberresektion (C, LR+Feb) zeigt keinen Einfluss auf das pulmonale Leukozyten-Trapping im Vergleich zum pulmonalen Leukozyten-Trapping der Tiere, die ausschließlich einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden (C, LR). Mittelwert \pm SEM.

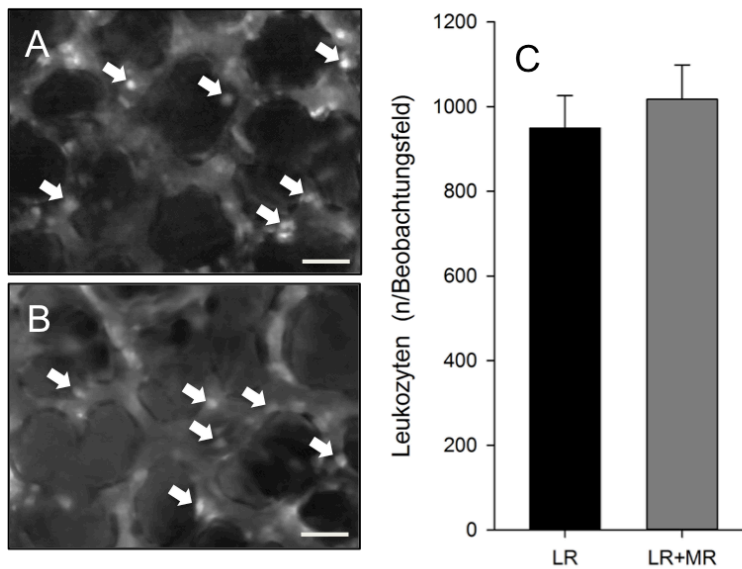


Abbildung 21: Intravitalmikroskopische Bilder des pulmonalen Leukozyten-Trapping der Resektion-Gruppe (A) und der Splenektomie-Gruppe (B); Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten (Pfeile) in Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstab 40µm; (C) Die im Rahmen der Leberresektion durchgeführte Milzresektion (C, LR+MR) zeigt keinen Einfluss auf das pulmonale Leukozyten-Trapping im Vergleich zum pulmonalen Leukozyten-Trapping der Tiere, die ausschließlich einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden (C, LR). Mittelwert \pm SEM.

Pulmonale funktionelle Kapillardichte

Die ausgedehnte Leberresektion verursachte 24h postoperativ eine tendenziell reduzierte pulmonale funktionelle Kapillardichte der Versuchstiere im Vergleich zur pulmonalen funktionellen Kapillardichte Sham-operierter Tiere (Abb. 22) (Resektion-Gruppe: $707,4 \pm 65,3 \text{ cm/cm}^2$ vs. Sham-Gruppe: $862,3 \pm 43,0 \text{ cm/cm}^2$; $p > 0,05$), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Die pulmonale funktionelle Kapillardichte stieg in Tieren, die 24h präoperativ mit Febuxostat vorbehandelt worden waren, im Vergleich zur pulmonalen funktionellen Kapillardichte ausschließlich leberresezierter Tiere signifikant an ($991,1 \pm 40,7 \text{ cm/cm}^2$; $P < 0,05$ vs. Resektion-Gruppe). Ein signifikanter Anstieg der pulmonalen funktionellen Kapillardichte konnte auch in Tieren, bei denen eine simultane Milzresektion durchgeführt wurde, im Vergleich zur pulmonalen funktionellen Kapillardichte ausschließlich leberresezierter Tiere festgestellt werden ($909,4 \pm 52,0 \text{ cm/cm}^2$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe).

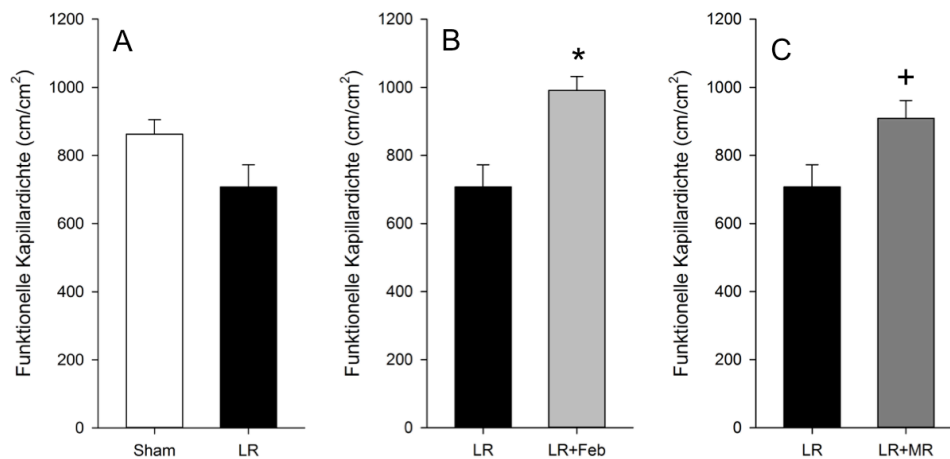


Abbildung 22: Die pulmonale funktionelle Kapillardichte 24h nach Operation. (A) Die ausgedehnte Leberresektion (A, LR) führte 24h postoperativ zu einer tendenziell geringeren pulmonalen funktionellen Kapillardichte im Vergleich zur pulmonalen funktionellen Kapillardichte Sham-operierter Tiere (A, Sham), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. (B) Die Vorbehandlung mit Febuxostat 24h vor Leberresektion (B, LR+Feb) führte zu einem signifikanten Anstieg der pulmonalen funktionellen Kapillardichte im Vergleich zur pulmonalen funktionellen Kapillardichte bei Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde (B, LR). (C) Die simultan zur ausgedehnten Leberresektion durchgeführte Splenektomie (C, LR+MR) zeigte einen signifikanten Anstieg der pulmonalen funktionellen Kapillardichte im Vergleich zur pulmonalen funktionellen Kapillardichte bei Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde (C, LR). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. LR. + $p < 0,05$ vs. LR.

6.1.2 Mikrohämodynamik

Mikrohämodynamische Parameter der pulmonalen Venolen

Die untersuchten Venolen der Versuchsgruppen wiesen einen Gefäßdurchmesser von 18,8µm bis 23,7µm auf. Die Blutzellgeschwindigkeit in diesen Venolen lag zwischen 850,7µm/s und 963,6µm/s ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Daraus errechnete sich eine Scherrate von 311,5s⁻¹ bis 375,0s⁻¹ und ein mikrovaskulärer Blutfluss von 157,4pl/s bis 250,5pl/s (Tabelle 4).

	Sham	LR	LR+Feb	LR+MR
Durchmesser (µm)	18,8±1,4	19,6±1,4	23,7±1,8	22,5±0,8
Blutzellgeschwindigkeit (µm/s)	863,7±60,2	850,7±90,5	888,1±51,9	963,6±26,0
Scherrate (s⁻¹)	375,0±31,8	348,0±32,1	311,5±33,2	344,2±10,9
Mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s)	157,4±26,2	175,1±37,4	250,5±38,8	242,0±20,1

Tabelle 4: Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Scherrate und mikrovaskulärer Blutfluss in den pulmonalen Venolen der Sham-, Resektion-, Febuxostat- und Splenektomie-Gruppe. Die mikrohämodynamischen Parameter in den pulmonalen Venolen ändern sich im Vergleich zur Sham-Gruppe nicht. Mittelwert ± SEM.

Mikrohämodynamische Parameter der pulmonalen Arteriolen

Die untersuchten Arteriolen zeigten einen Gefäßdurchmesser von 29,8µm bis 31,6µm. Die Blutzellgeschwindigkeit innerhalb der Arteriolen lag zwischen 513,8µm/s bis 631,7µm/s ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Aus den gemessenen Werten errechnete sich eine Scherrate von 141,0s⁻¹ -168,7s⁻¹ und ein mikrovaskulärer Blutfluss von 228,4pl/s bis 307,8pl/s (Tabelle 5).

	Sham	LR	LR+Feb	LR+MR
Durchmesser (μm)	29,8 \pm 1,7	31,4 \pm 0,7	30,5 \pm 1,0	31,6 \pm 1,3
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	513,8 \pm 29,6	595,8 \pm 50,5	631,7 \pm 71,3	620,0 \pm 58,5
Scherrate (s^{-1})	141,0 \pm 11,4	153,0 \pm 15,1	168,7 \pm 23,8	158,8 \pm 18,1
Mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s)	228,4 \pm 30,6	285,9 \pm 19,8	284,1 \pm 23,7	307,8 \pm 38,0

Tabelle 5: Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Scherrate und mikrovaskulärer Blutfluss in den pulmonalen Arteriolen der Sham-, Resektion-, Febuxostat- und Splenektomie-Gruppe. Die mikrohämodynamischen Parameter in den pulmonalen Arteriolen ändern sich im Vergleich zur Resektion-Gruppe nicht. Mittelwert \pm SEM.

6.2 Wet-to-Dry Weight Ratio

Bei der Untersuchung der Wet-to-Dry Weight Ratio des Lungengewebes als Indikator für das Vorliegen eines Lungenödems ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachweisen (Abb. 23).

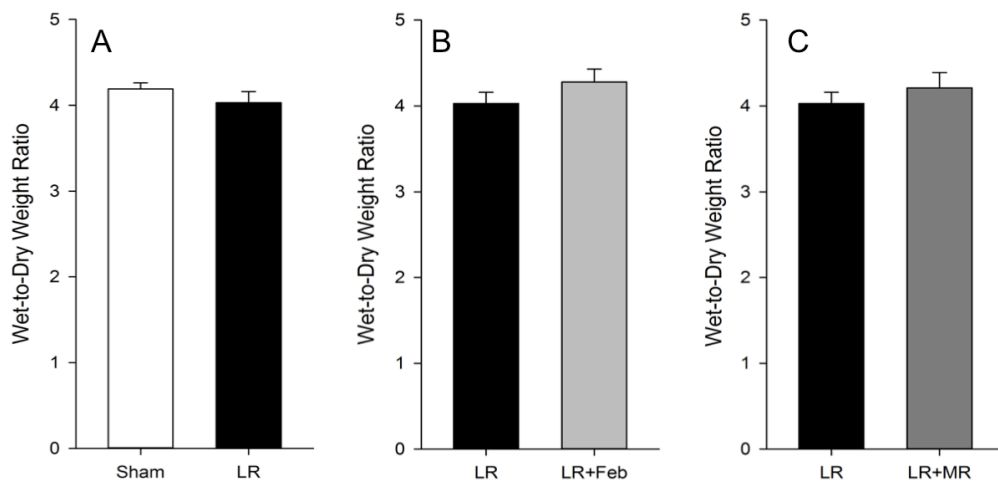


Abbildung 23: Messung der pulmonalen Wet-to-Dry Weight Ratio 24h nach Leberresektion. (A) Zwischen dem Lungengewebe Sham-operierter Tiere (A, Sham) und dem Lungengewebe leberresezierter Tiere (A, LR) ändert sich die Wet-to-Dry Weight Ratio nicht. (B) Zwischen dem Lungengewebe ausschließlich leberresezierter Tiere (B, LR) und dem Lungengewebe der Tiere, die 24h präoperativ Febuxostat verabreicht bekommen hatten (B, LR+Feb), ist kein Unterschied der Wet-to-Dry Weight Ratio zu erkennen. (C) Die pulmonale Wet-to-Dry Weight Ratio des Lungengewebes bleibt zwischen Tieren nach ausschließlich ausgedehnter Leberresektion (C, LR) und Tieren nach simultaner Splenektomie (C, LR+MR) unverändert. Mittelwert \pm SEM.

6.3 Histologische/ Immunhistochemische Ergebnisse

6.3.1 Aktivierte cleaved Caspase-3

Im Vergleich zu Sham-operierten Versuchstieren führte die ausgedehnte Leberresektion 24h postoperativ zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate pulmonaler Zellen (Abb. 24) (Resektion-Gruppe: $1,7 \pm 0,3\%$ vs. Sham-Gruppe: $0,4 \pm 0,1\%$; $p < 0,05$). Die präoperative Inhibition der XOR verursachte eine tendenziell verminderte Anzahl apoptotischer Zellen im Lungengewebe (Abb. 25) ($1,1 \pm 0,2\%$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu zeigte eine simultane Splenektomie im Rahmen der ausgedehnten Leberresektion keinen Einfluss auf die Apoptoserate pulmonaler Zellen (Abb. 26) ($1,5\% \pm 0,2$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe).

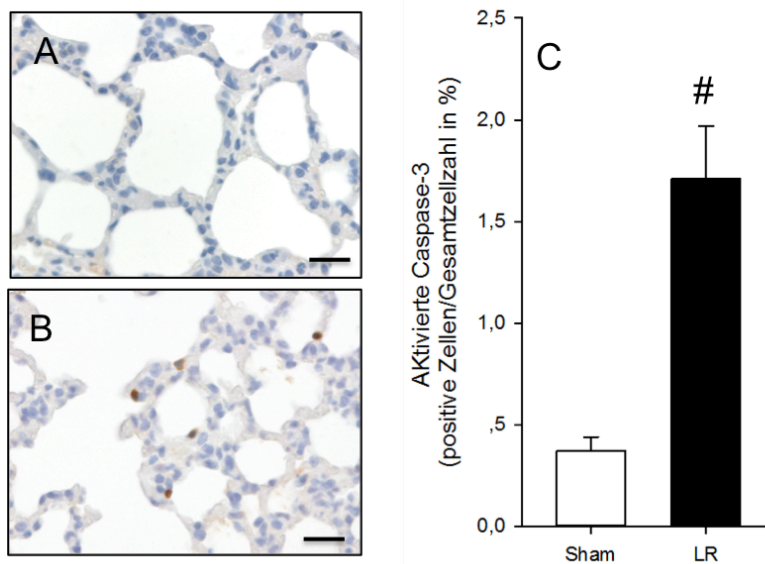


Abbildung 24: (A;B) Aktivierte Caspase-3-positive Zellen 24h nach Operation im Lungengewebe der Sham-Gruppe (A) und im Lungengewebe der Resektion-Gruppe (B); Maßstab: 20µm; (C) Die ausgedehnte Leberresektion (C, LR) führte im Lungengewebe zu signifikant mehr aktivierte Caspase-3-positiven Zellen als im Lungengewebe Sham-operierter Tiere (C, Sham). Mittelwert \pm SEM. [#] $p < 0,05$ vs. Sham.

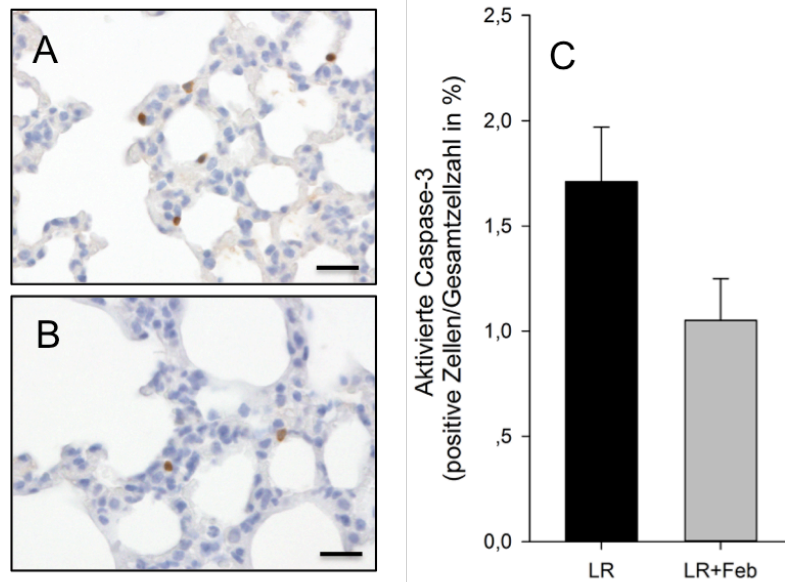


Abbildung 25: (A;B) Aktivierte Caspase-3-positive Zellen 24h nach Operation im Lungengewebe der Resektion-Gruppe (A) und im Lungengewebe der Febuxostat-Gruppe (B); Maßstab: 20μm; (C) Die präoperative Applikation von Febuxostat (C, LR+Feb) führte im Lungengewebe zu tendenziell weniger aktivierte Caspase-3-positiven Zellen als im Lungengewebe von ausschließlich leberresezierten Tieren (C, LR), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Mittelwert \pm SEM.

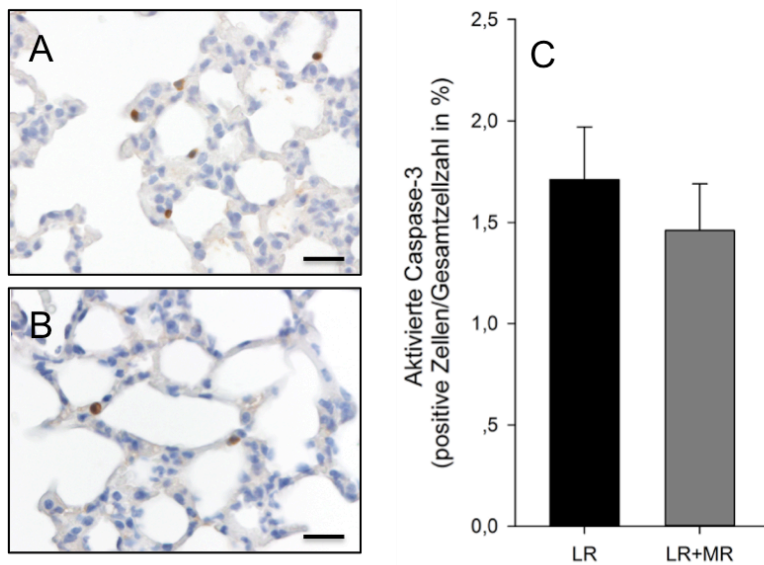


Abbildung 26: (A;B) Aktivierte Caspase-3-positive Zellen 24h nach Operation im Lungengewebe der Resektion-Gruppe (A) und im Lungengewebe der Splenektomie-Gruppe (B); Maßstab 20μm; (C) Im Lungengewebe der Tiere bei denen eine simultane Splenektomie durchgeführt wurde (C, LR+MR) sind unverändert viele aktivierte Caspase-3-positive Zellen im Lungengewebe im Vergleich zu Tieren bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde (C, LR). Mittelwert \pm SEM.

6.3.2 Myeloperoxidase Färbung

Der Anteil an MPO-positiven Zellen im Lungengewebe stieg 24h nach ausgedehnter Leberresektion signifikant an im Vergleich zum Anteil an MPO-positiven Zellen im Lungengewebe Sham-operierter Tiere (Abb. 27) (Resektion-Gruppe: $18,6 \pm 0,9\%$ vs. Sham-Gruppe: $10,7 \pm 1,5\%$; $p < 0,05$). Analog zur verminderten Leukozytenadhärenz in den pulmonalen Venolen und Arteriolen nach präoperativer Applikation von Febuxostat, war im Lungengewebe dieser Gruppe eine tendenzielle Reduktion der MPO-positiven Zellen zu verzeichnen (Abb. 28) ($13,7 \pm 2,3\%$; $p > 0,05$ vs. Resektion-Gruppe), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Im Lungengewebe bei Tieren, bei denen eine simultane Splenektomie im Rahmen der ausgedehnten Leberresektion durchgeführt wurde, konnte der Anteil an MPO-positiven Zellen im Lungengewebe signifikant reduziert werden (Abb. 29) ($14,1 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$ vs. Resektion-Gruppe).

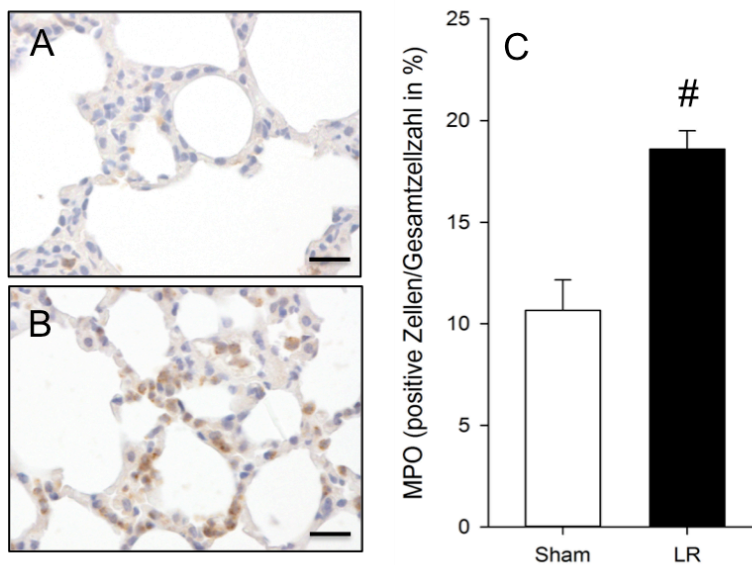


Abbildung 27: (A;B) MPO-positive Zellen 24h nach Operation im Lungengewebe der Sham-Gruppe (A) und im Lungengewebe der Resektion-Gruppe (B); Maßstab: 20µm; (C) Die ausgedehnte Leberresektion (C, LR) führte im Lungengewebe zu signifikant mehr MPO-positiven Zellen als im Lungengewebe Sham-operierter Tiere (C, Sham). Mittelwert \pm SEM. # $p < 0,05$ vs. Sham.

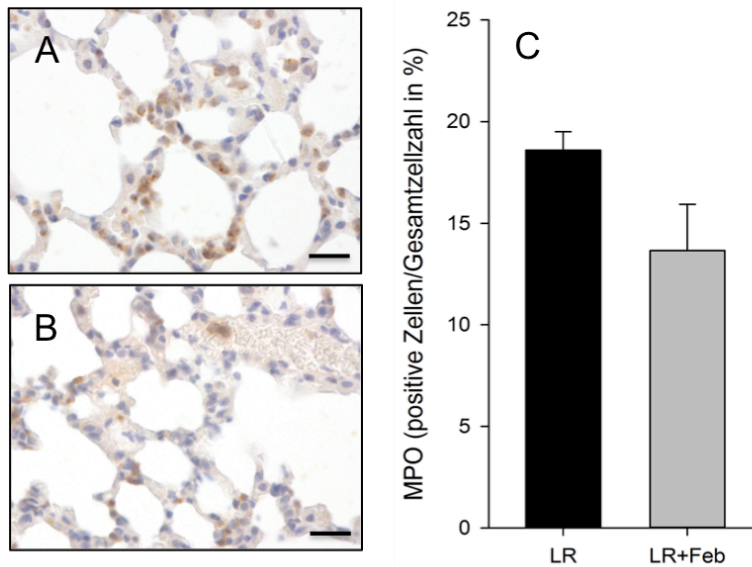


Abbildung 28: (A;B) MPO-positive Zellen 24h nach Operation im Lungengewebe der Resektion-Gruppe (A) und im Lungengewebe der Febuxostat-Gruppe (B); Maßstab: 20µm; (C) Im Lungengewebe der 24h präoperativ mit Febuxostat behandelten Tiere (C, LR+Feb) sind tendenziell weniger MPO-positive Zellen als im Lungengewebe der Tiere die ausschließlich einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden (C, LR), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Mittelwert \pm SEM.

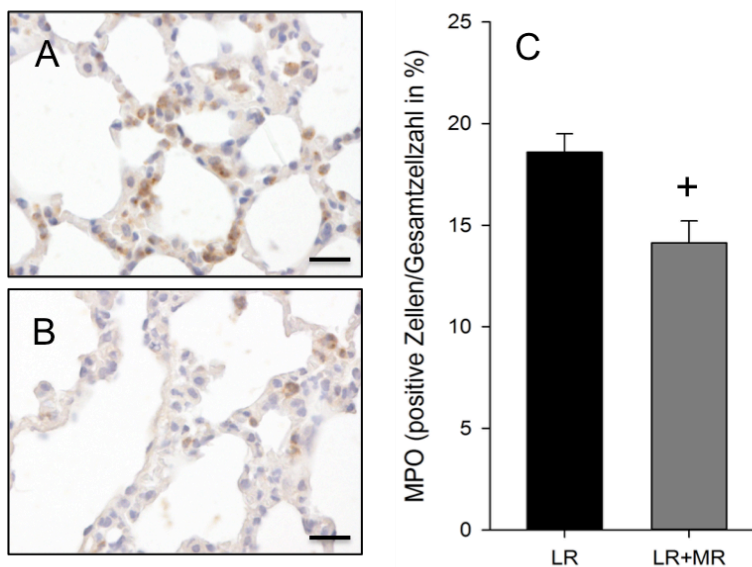


Abbildung 29: (A;B) MPO-positive Zellen 24h nach Operation im Lungengewebe der Resektion-Gruppe (A) und im Lungengewebe der Splenektomie-Gruppe (B); Maßstab 20µm; (C) Im Lungengewebe der Tiere bei denen eine simultane Splenektomie durchgeführt wurde (C, LR+MR) sind signifikant weniger MPO-positive Zellen als im Lungengewebe von Tieren bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde (C, LR). Mittelwert \pm SEM. ⁺ $p < 0,05$ vs. LR.

6.5 Ergebnisse Western-Blot Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurde auf einem Gel die Sham-Gruppe (n=7) mit der Resektion-Gruppe (n=7) mit jeweils sieben Banden und auf einem zweiten Gel die Resektion-Gruppe mit der Febuxostat-Gruppe (n=7) verglichen. Hier werden vier Banden pro Blot repräsentativ gezeigt.

6.5.1 MPO-Expression

Die MPO-Expression im Lungengewebe Sham-operierter Tiere lag bei $5,0 \pm 0,6 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$. Im Vergleich dazu stieg die MPO-Expression im Lungengewebe der Tiere nach ausgedehnter Leberresektion signifikant an (Abb. 30) ($8,3 \pm 1,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ $p < 0,05$ vs. Sham-Gruppe). Die Applikation von Febuxostat 24h präoperativ führte zu einer tendenziellen Erniedrigung der MPO-Expression im Gewebe (Abb. 31) (Febuxostat-Gruppe: $6,7 \pm 0,6 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Resektion-Gruppe: $8,1 \pm 0,6 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ $p > 0,05$), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war.

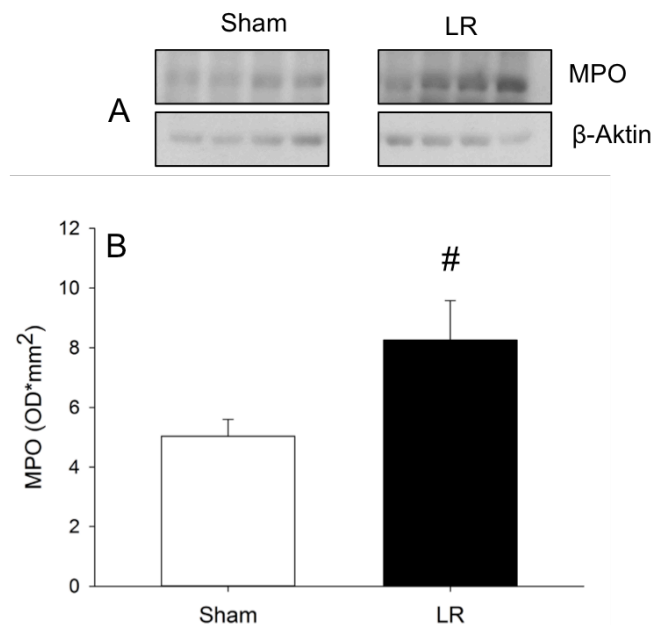


Abbildung 30: (A) Western-Blot Analyse der MPO-Expression im Lungengewebe der Sham-Gruppe und der Resektion-Gruppe. (B) Die MPO-Expression ist im Lungenparenchym nach ausgedehnter Leberresektion (B, LR) signifikant höher als im Lungenparenchym Sham-operierter Mäuse (B, Sham). Mittelwert \pm SEM. [#] $p < 0,05$ vs. Sham.

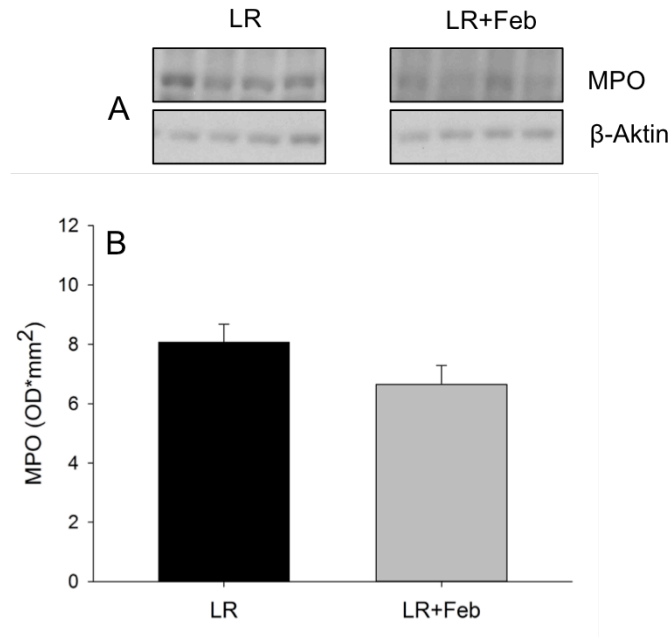


Abbildung 31: (A) Western-Blot Analyse der MPO-Expression im Lungengewebe der Resektion-Gruppe und der Febuxostat-Gruppe. (B) Die MPO-Expression ist im Lungenparenchym der Tiere, die 24h präoperativ Febuxostat appliziert bekommen hatten (B, LR+Feb) tendenziell niedriger als im Lungenparenchym der ausschließlich leberresezierten Tiere (B, LR), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war.

6.5.2 Aktivierte Caspase-3-Expression

Im Vergleich zum Lungengewebe Sham-operierter Tiere zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der aktivierten Caspase-3 im Lungengewebe der Tiere, bei denen eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde (Abb. 32) (Resektion-Gruppe: $7,3 \pm 1,1 \text{ OD*mm}^2$ vs. Sham-Gruppe: $4,7 \pm 0,5 \text{ OD*mm}^2$; $p > 0,05$). Im Vergleich zum Lungengewebe von Tieren, die ausschließlich einer ausgedehnten Leberresektion unterzogen wurden, hatte das Lungengewebe der Tiere, die 24h präoperativ Febuxostat verabreicht bekommen hatten, signifikant weniger aktivierte Caspase-3 im Lungengewebe (Abb. 33) (Febuxostat-Gruppe: $4,2 \pm 0,6 \text{ OD*mm}^2$ vs. Resektions-Gruppe: $6,8 \pm 0,5 \text{ OD*mm}^2$; $p < 0,05$).

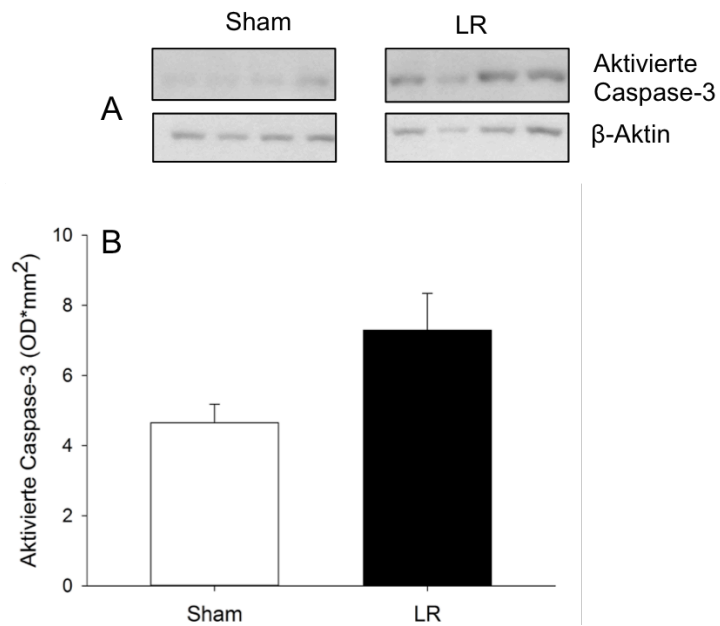


Abbildung 32: (A) Western-Blot Analyse der aktivierten Caspase-3-Expression im Lungengewebe der Sham-Gruppe und Resektion-Gruppe. (B) Die aktivierte Caspase-3-Expression ist im Lungenparenchym nach ausgedehnter Leberresektion (B, LR) tendenziell höher als im Lungenparenchym Sham-operierter Mäuse (B, Sham), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Mittelwert \pm SEM.

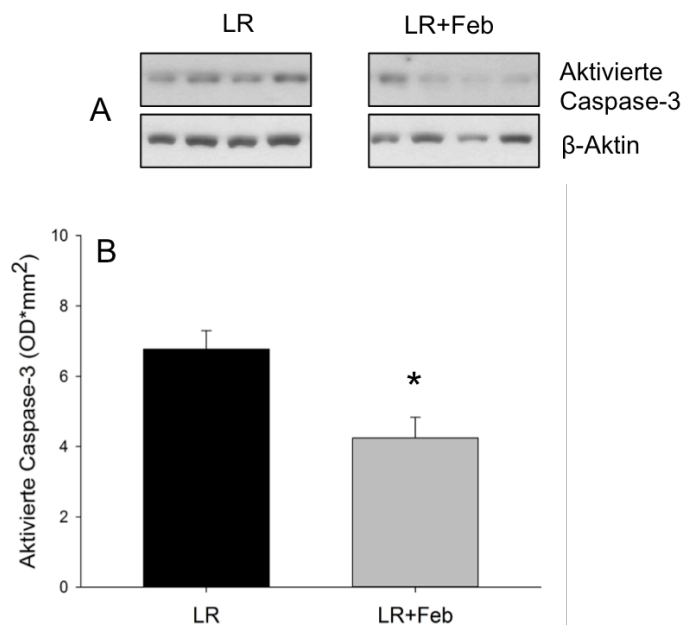


Abbildung 33: (A) Western-Blot Analyse der aktivierten Caspase-3-Expression im Lungengewebe der Resektion-Gruppe und der Febuxostat-Gruppe. (B) Die aktivierte Caspase-3-Expression ist im Lungenparenchym der Tiere, die 24h präoperativ Febuxostat appliziert bekommen hatten (B, LR+Feb) signifikant niedriger als im Lungenparenchym nach ausschließlich ausgedehnter Leberresektion (B, LR). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. LR.

6.5.3 Xanthindehydrogenase-Expression

Im Vergleich zu Sham-operierten Tieren führte die ausgedehnte Leberresektion zu einem Anstieg der XDH-Expression im Lungengewebe der Resektion-Gruppe (Abb. 34) (Resektion-Gruppe: $6,7 \pm 0,8 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Sham-Gruppe: $4,4 \pm 0,8 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p > 0,05$), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Im Vergleich zu Tieren bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde, wurde durch die Applikation von Febuxostat 24h präoperativ die Expression des Enzyms im Lungengewebe signifikant reduziert (Abb. 35) (Febuxostat-Gruppe: $3,4 \pm 0,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Resektion-Gruppe: $5,2 \pm 0,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p < 0,05$).

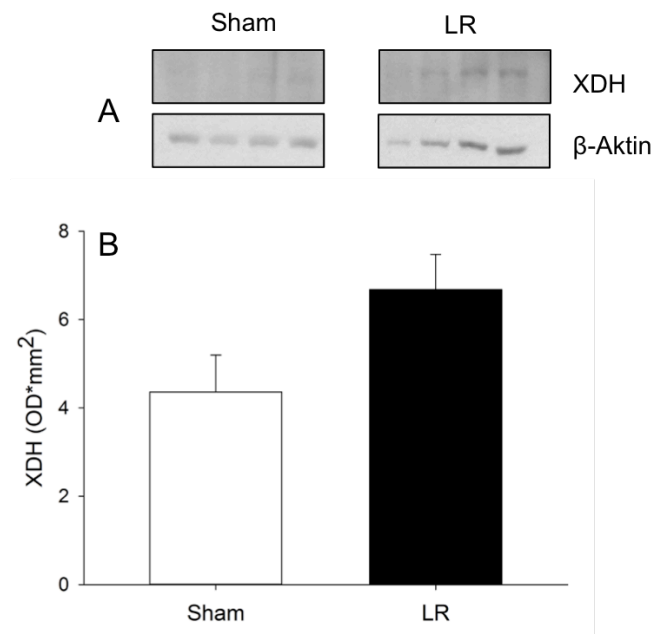


Abbildung 34: (A) Western-Blot Analyse der XDH-Expression im Lungengewebe der Sham-Gruppe und der Resektion-Gruppe. (B) Die XDH-Expression ist im Lungenparenchym nach ausgedehnter Leberresektion (B, LR) höher als im Lungenparenchym Sham-operierter Mäuse (B, Sham), wenngleich der Unterschied nicht signifikant war. Mittelwert \pm SEM.

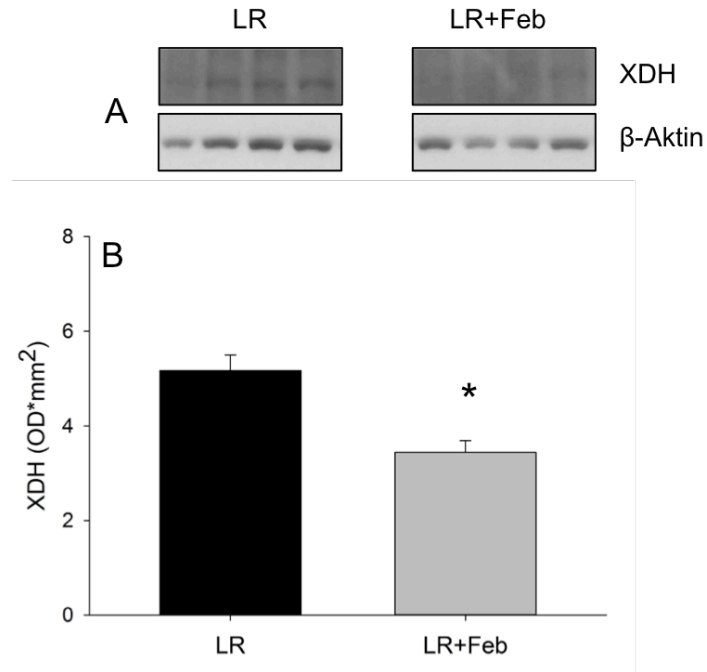


Abbildung 35: (A) Western-Blot Analyse der XDH-Expression im Lungengewebe mit der Resektion-Gruppe und der Febuxostat-Gruppe. (B) Die XDH-Expression ist im Lungenparenchym der Tiere, die 24h präoperativ Febuxostat appliziert bekommen hatten (B, LR+Feb), signifikant niedriger als im Lungenparenchym nach ausschließlich ausgedehnter Leberresektion (B, LR). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. LR.

6.5.4 Xanthinoxidase-Expression

Im Vergleich zu Sham-operierten Tieren war die XOD-Expression im Lungengewebe von Tieren, bei denen eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde, signifikant vermindert (Abb. 36) (Resektion-Gruppe: $4,4 \pm 0,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Sham-Gruppe: $5,5 \pm 0,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p < 0,05$). Die Vorbehandlung mit Febuxostat 24h präoperativ führte zur signifikanten Reduktion der Enzymexpression im Lungenparenchym verglichen mit der Enzymexpression im Lungenparenchym der Tiere bei denen ausschließlich eine ausgedehnten Leberresektion durchgeführt wurde (Abb. 37) (Febuxostat-Gruppe: $3,1 \pm 0,4 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. Resektion-Gruppe: $4,6 \pm 0,2 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p < 0,05$).

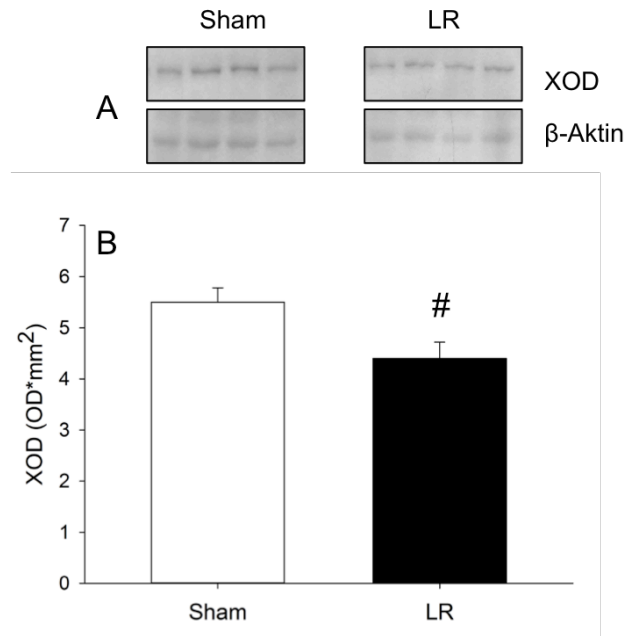


Abbildung 36: (A) Western-Blot Analyse der XOD-Expression im Lungengewebe der Sham-Gruppe und der Resektion-Gruppe. (B) Die XOD-Expression ist im Lungenparenchym nach ausgedehnter Leberresektion (B, LR) signifikant niedriger als im Lungenparenchym Sham-operierter Mäuse (B, Sham). Mittelwert \pm SEM. [#] $p < 0,05$ vs. Sham.

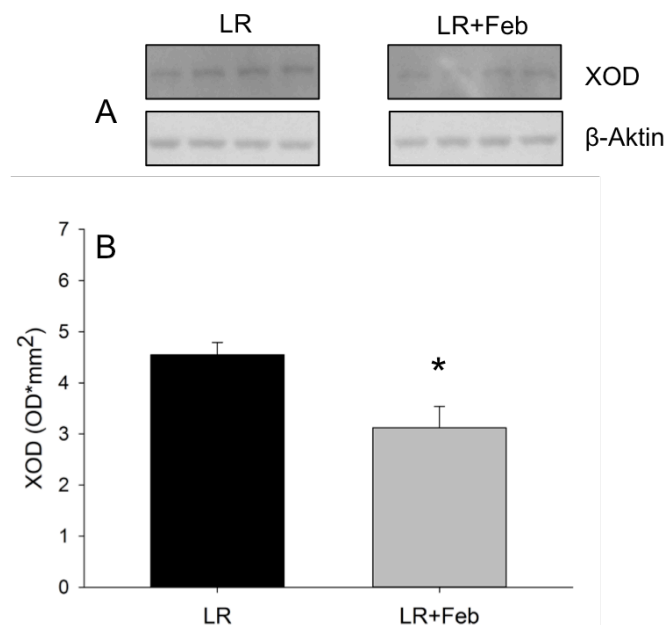


Abbildung 37: (A) Western-Blot Analyse der XOD-Expression im Lungengewebe der Resektion-Gruppe und der Febuxostat-Gruppe. (B) Die XOD-Expression ist im Lungenparenchym der Tiere, die 24h präoperativ Febuxostat appliziert bekommen hatten (B, LR+Feb), signifikant niedriger als im Lungenparenchym nach ausschließlich ausgedehnter Leberresektion (B, LR). Mittelwert \pm SEM. ^{*} $p < 0,05$ vs. LR.

7. Zusammenfassung der Ergebnisse

7.1 Einfluss einer ausgedehnten Leberresektion auf die Mikrozirkulation der Lunge

- I. Die ausgedehnte Leberresektion führt im Vergleich zu Sham-operierten Tieren zu einem tendenziellen Anstieg rollender Leukozyten in den pulmonalen Venolen und Arteriolen.
- II. Die ausgedehnte Leberresektion führt verglichen mit Sham-operierten Tieren in den pulmonalen Arteriolen und Venolen zu einer signifikant höheren Anzahl adhärenter Leukozyten
- III. Die ausgedehnte Leberresektion führt verglichen mit Sham-operierten Tiere im Kapillarfeld der Lunge zu einem signifikant höheren Leukozyten-Trapping.
- IV. Die ausgedehnte Leberresektion führt verglichen mit Sham-operierten Tieren zu einer signifikant höheren Apoptoserate und zu einer signifikant erhöhten MPO-Aktivität im Lungengewebe.

7.2 Einfluss der Inhibition der Xanthinoxidoreduktase auf die Mikrozirkulation der Lunge nach ausgedehnter Leberresektion

- I. Die Inhibition der Xanthinoxidoreduktase 24h vor ausgedehnter Leberresektion hat keinen Einfluss auf das Leukozyten-Rolling in den pulmonalen Arteriolen und Venolen nach ausgedehnter Leberresektion im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.
- II. Die Inhibition der Xanthinoxidoreduktase 24h vor ausgedehnter Leberresektion senkt die Leukozytenadhärenz in pulmonalen Arteriolen und Venolen signifikant im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.
- III. Die Inhibition der Xanthinoxidoreduktase 24h vor ausgedehnter Leberresektion beeinflusst das kapillare Leukozyten-Trapping nicht im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.

- IV. Die Inhibition der Xanthinoxidoreduktase 24h vor ausgedehnter Leberresektion reduziert die Apoptoserate signifikant und die MPO-Aktivität tendenziell im Lungengewebe im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.

7.3 Einfluss einer im Rahmen der Leberresektion durchgeführten Splenektomie auf die Mikrozirkulation der Lunge

- I. Die simultan zur Leberresektion durchgeführte Splenektomie erhöht tendenziell das Leukozyten-Rolling in den pulmonalen Venolen und Arteriolen der Lunge im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.
- II. Die simultan zur Leberresektion durchgeführte Splenektomie senkt tendenziell die Leukozytenadhärenz in den pulmonalen Arteriolen und Venolen der Lunge im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.
- III. Die simultan zur Leberresektion durchgeführte Splenektomie hat keinen Einfluss auf das pulmonale Leukozyten-Trapping im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.
- IV. Die simultan zur Leberresektion durchgeführte Splenektomie senkt die Apoptoserate tendenziell und die MPO-Aktivität signifikant im Lungengewebe im Vergleich zu Tieren, bei denen ausschließlich eine ausgedehnte Leberresektion durchgeführt wurde.

8. Diskussion

8.1 Diskussion des Modells

8.1.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Analyse von mikrohämodynamischen, zellulären und molekularen Prozessen von Organen. Es kann unter anderem die Angiogenese von benignem (Laschke et al., 2005) und malignem Gewebe (Kollmar et al., 2007; Laschke et al., 2005), die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten mit Endothelzellen der Blutgefäß (Laschke et al., 2008), sowie der apoptotische (Vollmar et al., 2001) und der nekrotische Zelltod (Huwer et al., 1998) beobachtet und analysiert werden.

Bei der intravitale Fluoreszenzmikroskopie kann die Epi-Illuminations- und Trans-Illuminationstechnik angewendet werden (Menger und Lehr, 1993). Bei der Trans-Illuminationstechnik befindet sich das zu untersuchende Gewebe zwischen Lichtquelle und detektierendem Mikroskop (Kleshnin et al., 2015). Die Trans-Illuminationstechnik wird beispielsweise bei der Mikroskopie des Kaninchenohres (Cliff, 1966), des Mesenterium (Werr et al., 1998) oder des Cremastermuskels (Mempel et al., 2003) verwendet. Bei der Epi-Illuminationstechnik befindet sich die Lichtquelle und das detektierende Mikroskop auf der selben Seite (Kleshnin et al., 2015). Bei Organen, die wegen ihrer Ausdehnung sowie fehlender Lichtdurchlässigkeit nicht mit der Trans-Illuminationstechnik analysiert werden können, wird weitgehend die Epi-Illuminationstechnik angewendet (Roller, 2010). Solide Organe, wie Leber (Roller et al., 2010), Gehirn (Gavins et al., 2007) oder Herz (Schramm et al., 2007) beispielsweise, werden mit der Epi-Illuminationstechnik untersucht.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Lunge wurde erstmals am Hund durchgeführt. Dabei wurde den Tieren ein Beobachtungsfenster implantiert, um so verschiedene Strukturen der Lunge mikroskopieren zu können (Wagner und Filley, 1965). In Kleintiermodellen wurde eine ähnliche Herangehensweise für Kaninchen (Kuhnle et al., 1993), Ratten (McCormack et al., 2000) und Mäuse (Looney et al., 2011; Tabuchi et al., 2008) verwendet. Der Vorteil bei der Verwendung von Mäusen ist, dass eine Vielzahl von Knockout Stämmen und spezifische Antikörper erhältlich sind.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Lunge erlaubt die Analyse subpleuraler Gefäße. Dabei kann die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den verschiedenen Gefäßabschnitten der Lunge analysiert werden. Zusätzlich ermöglicht die Technik die Analyse mikrohämodynamischer Parameter, wie der Blutzellgeschwindigkeit und des Gefäßdurchmesser. Daraus kann der mikrovaskuläre Blutfluss und die Scherrate berechnet werden.

Zur intravitale Fluoreszenzmikroskopie der pulmonalen Mikrozirkulation sind bereits verschiedene Techniken etabliert. Tabuchi et al. präparierte zuerst ein Fenster im rechten Thorax frei. Das Thoraxfenster wird mit einem Deckglas bedeckt und mit einem Acrylkleber befestigt. Von Vorteil bei dieser Methode ist, dass durch einen transdiaphragmalen Katheter der physiologische intrathorakale Druck wieder hergestellt wird (Tabuchi et al., 2008).

Mit Hilfe der Methode von Looney et al. können die Gefäße der Lunge analysiert werden. Ein kreisförmiger Teil der rechten lateralen Thoraxwand wird reseziert. Daraufhin wird ein Stahlring auf der Öffnung des Thorax positioniert. Dieser Stahlring ist mit einer Vakuumpumpe verbunden. Durch Anlegen eines Unterdrucks kann das Lungengewebe an ein Deckglas gezogen werden, wodurch Bewegungsartefakte minimiert werden können (Looney et al., 2011).

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Technik erfolgte eine offene Exposition des Thorax. Dazu wird das Zwerchfell breit eröffnet. Daraufhin wird eine Sternotomie durchgeführt. Diese Schritte ermöglichen eine vollständige Lateralisierung der Thoraxwand, wodurch eine große Fläche zur Mikroskopie geschaffen wird. Durch korrekte Lagerung sowie die Anlage eines positiven endexpiratorischen Druckes können Bewegungsartefakte minimiert werden. Die offene Darstellung des Lungengewebes hat gegenüber den anderen Techniken den Nachteil der größeren Invasivität. Dennoch konnte bereits gezeigt werden, dass die mikrohämodynamischen Parameter der Modelle vergleichbar sind (Roller et al., 2011).

Bei der intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Lunge muss berücksichtigt werden, dass oberflächliche, das heißt subpleurale Gefäße, analysiert werden (Tabuchi et al., 2008). Diese unterscheiden sich im anatomischen Aufbau, Verteilungsdichte im Gewebe und Durchmesser (Short et al., 1996). Es ist nicht eindeutig geklärt, ob Abläufe, wie die Leukozytenrekrutierung, in tiefergelegenen Gefäßen unterschiedlich abläuft im Vergleich zu den subpleuralen Gefäßen (Kuebler et al., 1994). Dennoch wird vermutet, dass grundlegende physiologische Prozesse in

subpleuralen Gefäßen und tieferliegenden Gefäßen vergleichbar sind (Tabuchi et al., 2008). Darüber hinaus wurden in unserem Modell tiefere Strukturen des analysiert Organs mit Hilfe von histologischen Schnitten ausgewertet.

Bei Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen und die Lichtexposition des Gewebes zur Bildung von ROS und Wärme führen kann. Als Folge kann es zu phototoxischen Reaktionen kommen, wodurch sowohl die mikrovaskuläre Perfusion als auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflusst werden können (Steinbauer et al., 2000). Daher wurde nur eine Mindestmenge an Farbstoffen verwendet. Ebenso wurde die Zeit der Mikroskopie möglichst gering gehalten, indem die Auswertung der Bilder off-line erfolgte.

8.1.2 Leberresektion

Bereits früher konnte gezeigt werden, dass die Ischämie/Reperfusion der Leber, beispielsweise im Rahmen eines Pringle-Manövers, zu einem akuten Lungenschaden mit Lungenödem und zu einer Apoptose des Lungengewebes führt (Oguz et al., 2015; Weinbroum et al., 1995; Zhou et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde die Leber nach Greene et al. reseziert. Die Technik ermöglicht eine schnelle und sichere Resektion des Organs (Greene und Puder, 2003), ohne dass dabei ein Pringle-Manöver durchgeführt werden muss. Somit können Prozesse in der Lunge analysiert werden, ohne dabei Einflussfaktoren durch Ischämie/Reperfusion beachten zu müssen.

Die ausgedehnte Leberresektion führt zu einer starken Einschränkung der Barrierefunktion des Darms. Bakterien und Endotoxine gelangen dadurch in das portale Blutgefäßsystem, Lymphgefäße, Leber und Lunge (Wang et al., 1995; Xu et al., 2007). Dieser Prozess wird als bakterielle Translokation bezeichnet. Ein Grund für die erhöhte Permeabilität der Darmbarriere ist, dass durch chirurgische Manipulation Mikrozirkulationstörungen in der Darmwand entstehen, wodurch die Integrität der Darmwand beeinträchtigt wird (Liu et al. 2007). Hierbei nimmt die XOR eine zentrale Rolle ein. Während eines chirurgischen Reizes werden ROS durch eine vermehrte Aktivierung der XOD in der Darmmukosa freigesetzt. ROS sind bei der Beeinträchtigung der Darmmukosa und der damit einhergehenden Funktionsstörung der Darmbarriere maßgeblich beteiligt (Anup et al., 2000).

Frühere Studien haben weiterhin gezeigt, dass die Leber ein wichtiges Organ der Immunabwehr darstellt, da sich in ihr der größte Anteil ortsständiger Makrophagen befindet (Medzhitov und Janeway, 2000). Makrophagen und besonders die Makrophagen der Leber, die Kupffer Zellen, spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem des Körpers. Im Zusammenhang mit einer ausgedehnten Leberresektion muss erwähnt werden, dass das Volumen des retikuloendothelialen Systems der Leber, das 90% der gesamten phagozytären Aktivität des Organismus einnimmt, durch die Leberresektion stark reduziert wird. Dadurch ermöglicht eine ausgedehnte Leberresektion eine Verbreitung von Endotoxinen und Bakterien in den gesamten Organismus (Matuschak und Rinaldo, 1988; Wang et al., 1995). Der Grund für die Sensibilität der Lunge auf pathophysiologische Vorgänge des Gastrointestinaltraktes ist unter anderem der Anatomie geschuldet. Dabei ist zu beachten, dass die Lunge das erste Kapillarbett ist, das den Lymphabfluss des Darms über den Ductus thoracicus aufnimmt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Endotoxine, wie Lipopolysaccharid (LPS), zu einer vermehrten Leukozytenrekrutierung in der Lunge führen (Sunil et al., 2002). Weiterhin sind Endotoxine an einer verstärkten Expression von leukozytären Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, wie ICAM-1, und damit an einer vermehrten Leukozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation der Lunge beteiligt (Kandasamy et al., 2012).

Studien zeigen, dass die Gabe eines XOR Inhibitors protektiv bei chirurgischen Eingriffen wirkt. In Ischämie/Reperfusion Modellen der Leber (Weinbroum et al., 1995), aber auch in Modellen der bakteriellen Translokation, führte die Hemmung der XOR zu einer Reduktion des Lungenschadens (Thomas et al., 2002). Die Barriereeinschränkung in der Darmwand, die durch chirurgische Reize entstehen, werden durch die Gabe eines XOR-Inhibitors vermindert (Anup et al., 2000). Dies führt zu einer Verringerung der bakteriellen Translokation. Es ist zu vermuten, dass die Wirkung von Febuxostat auf die Darmwand auch in unserem Model zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion in der Lunge führt. Eine Leberresektion führt zu einer portalen Hypertension (Kanematsu et al., 1985). Die portale Hypertension führt ebenfalls zur Beeinträchtigung der Darmbarriere und damit konsekutiv zu einer bakteriellen Translokation (Garcia-Tsao et al., 1993). In einer Studie von Chen et al. wurde gezeigt, dass die Ligatur der Milzarterie die portale Hypertension reduziert und die Integrität der Darmmukosa schützt. Folglich sinkt das Ausmaß der bakteriellen Translokation und damit die Endotoxinämie im Blut (Chen et al., 2013).

8.2 Diskussion der Ergebnisse

8.2.1 Die erweiterte Leberresektion führt zu einer Leukozytenakkumulation in der Lunge

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es nach einer ausgedehnten Leberresektion zu einer deutlichen Leukozytenrekrutierung in der Lunge mit einer erhöhten Anzahl adhärenter Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen, Venolen sowie einer Zunahme des Leukozyten-Trapplings in pulmonalen Kapillaren kommt. Hervorzuheben ist, dass die erhöhte Leukozyteninfiltration zu einer deutlich erhöhten Anzahl an apoptotischen Zellen im Lungengewebe führt.

Es ist bekannt, dass eine ausgedehnte Leberresektion zu einer systemischen Entzündungsreaktion des Körpers führt (Boermeester et al., 1995). Während einer systemischen Entzündungsreaktion des Körpers kann es auch zu einer massiven Leukozytenakkumulation in der Lunge kommen (Williams und Chambers, 2014).

Wie bereits beschrieben, ist die Leukozytenrekrutierung in ein Gewebe durch mehrere Schritte charakterisiert. Initial rollen Leukozyten entlang des Endothels, daraufhin folgt eine feste Adhärenz am Endothel und letztlich findet die Transmigration über die Gefäßwand ins Gewebe statt (Ley et al., 2007). Diese einzelnen Schritte werden über die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen, wie beispielsweise P-Selektin oder ICAM-1 reguliert (Bienvenu und Granger, 1993; Makgoba et al., 1988). Bereits früher konnte gezeigt werden, dass es nach ausgedehnter Leberresektion, zu einer systemischen Entzündungsreaktion (Boermeester et al., 1995) mit einem Anstieg an proinflammatorischen Molekülen im Serum kommt (Kimura et al., 2006). Dieser Anstieg an proinflammatorischen Zytokinen führt zu einer verstärkten Expression an leukozytären Adhäsionsmolekülen in der pulmonalen Mikrozirkulation (Wang et al., 2013;A; Wang et al., 2013;B). Entsprechend konnten wir nach ausgedehnter Leberresektion eine signifikant höhere Anzahl an adhärenten Leukozyten in pulmonalen Venolen und Arteriolen finden. Interessanterweise war das Leukozyten-Rolling in den pulmonalen Gefäßen 24h nach ausgedehnter Leberresektion nicht erhöht. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine erhöhte Leukozytenadhärenz in den pulmonalen Arteriolen und Venolen nicht ausschließlich auf ein vermehrtes Leukozyten-Rolling zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang konnte bereits

früher gezeigt werden, dass die Leukozyten-Endothelzell-Adhärenz in pulmonalen Gefäßen nicht zwingend vom Leukozyten-Rolling abhängig ist (Wang et al., 2013;B).

Wir konnten zeigen, dass die erweiterte Leberresektion zu einem signifikant höheren Leukozyten-Trapping in den pulmonalen Kapillaren führt. Bei einer systemischen Entzündungsreaktion, wie sie nach einer erweiterten Leberresektion entsteht (Boermeester et al., 1995), kommt es vor allem im Kapillarfeld der Lunge zur Rekrutierung von Leukozyten (Wang et al., 2013;B). Hierbei gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass das Leukozyten-Trapping hauptsächlich durch mechanische Faktoren und weniger durch Adhäsionsmoleküle gesteuert wird (Doerschuk et al., 1993; Worthen et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Adhäsionsmoleküle wie P- und E-Selektin im Kapillarbett nicht exprimiert werden (Feuerhake et al., 1998). Zudem übersteigt der Durchmesser der Leukozyten (5-9µm) den Durchmesser der pulmonalen Kapillargefäßen (6µm) (Doerschuk et al., 1987). Ein Leukozyt, muss um das pulmonale Kapillarfeld zu durchqueren seine Form verändern (Gebb et al., 1995). Werden neutrophile Granulozyten während einer systemischen Entzündungsreaktion aktiviert, verlieren sie durch Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin Filamenten ihre Verformbarkeit und werden „steifer“ und so im Kapillarfeld festgehalten (Wang et al., 2013;B; Worthen et al., 1989). Dadurch passieren Leukozyten nur eingeschränkt und langsamer das Kapillarfeld der Lunge (Doerschuk et al., 1987). Außerdem konnte bereits früher gezeigt werden, dass es im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion wie bei einer Sepsis zu vermehrter Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen kommt (Roller et al., 2013). Diese sind größer als Leukozyten und es wird vermutet, dass die Leukozyten-Thrombozyten Komplexe das Leukozyten-Trapping begünstigt (Kirschenbaum et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass es nach einer ausgedehnten Leberresektion zur grundlegenden Änderung von hämodynamischen Parametern kommt (Thasler et al., 2002). Bei Beurteilung der Leukozytenadhärenz im Gefäßsystem und dem Leukozyten-Trapping im Kapillarbett müssen die mikrohämodynamischen Parameter betrachtet werden. Eine Entzündungsreaktion kann zu einer Beeinflussung der mikrohämodynamischen Parameter führen. Die dadurch veränderte Scherrate auf das Gefäß kann die Leukozytenadhärenz am Endothel beeinflusse (Yoshida et al., 1997). Um auszuschließen, dass die Unterschiede der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion durch unterschiedliche hämodynamische Parameter hervorgerufen werden, wurde der Durchmesser der

Gefäße und die Blutzellgeschwindigkeit gemessen. Da sich die mikrohämodynamischen Parameter zwischen Sham-Gruppe und Resektion-Gruppe nicht unterschieden, ist zu vermuten, dass die Unterschiede der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nicht durch mikrohämodynamische Parameter hervorgerufen wurden.

24h nach ausgedehnter Leberresektion war die funktionelle Kapillardichte der Lunge signifikant reduziert. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Leukozyten-Trappings mit einer Reduktion der funktionellen Kapillardichte einhergeht. Hierbei werden die Kapillaren durch aktivierte Leukozyten okkludiert und der Blutfluss entsprechend beeinträchtigt (Roller, Wang et al. 2013). Die hieraus entstehenden Perfusionsausfälle können zu einer zusätzlichen Organschädigung beitragen.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass ein pulmonales Ödem, ebenfalls bedingt durch den erhöhten interstitiellen Druck, zu einer Obstruktion der Gefäße und damit zu einer verminderten funktionellen Kapillardichte führen kann (Fulkerson et al., 1996). Frühere Studien zeigten, dass eine systemische Entzündungsreaktion zu einem Lungenödem führt (Ipaktchi et al., 2006). In der vorliegende Arbeit wurde die Wet-to-Dry Weight Ratio als Indikator für ein Lungenödem verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass es 24h nach ausgedehnter Leberresektion zu keiner signifikanten Änderung der Wet-to-Dry Weight Ratio gekommen ist. Hieraus lässt sich schließen, dass die Reduktion der pulmonalen Kapillardichte nicht auf ein pulmonales Ödem zurückzuführen ist, sondern eher mit dem erhöhten Leukozyten-Trapping zusammenhängt. Gleichzeitig ist zu bedenken, dass eine ausgedehnte Leberresektion 24h nach Operation zu keiner Beeinträchtigung der Endothelintegrität führt. Jedoch zeigen einige Studien, dass sich nach Leberresektion ein leichtes bis moderates Lungenödem ausbilden kann. Dies prägt sich jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt als in unserem Modell gewählt aus (Thasler et al., 2002). Es ist anzunehmen, dass sich in unserem Modell 24h nach ausgedehnter Leberresektion noch kein Lungenödem ausgebildet hat.

Es ist allgemein bekannt, dass die Akkumulation von aktivierten Leukozyten in der Lunge zu einem Schaden am Gewebe durch die Ausschüttung von zytotoxischen Stoffen wie ROS führt und eine Apoptose von pulmonalen Epithelzellen induzieren kann (Chopra et al., 2009; Serrao et al., 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dahingehend festgestellt werden, dass die Anzahl apoptotischer Zellen 24h nach ausgedehnter Leberresektion im Lungengewebe signifikant

ansteigt und auf einen Zelluntergang im Lungengewebe hinweist.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass es 24h nach ausgedehnter Leberresektion zu einer vermehrten Leukozytenrekrutierung in der Lunge mit einem erhöhten apoptotischen Zelltod kommt.

8.2.2 Febuxostat hemmt die Leukozytenakkumulation in der Lunge nach einer erweiterten Leberresektion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Inhibition der XOR mit Febuxostat protektive Effekte auf die Lunge nach ausgedehnter Leberresektion hat. Wir konnten zeigen, dass die beschriebenen protektiven Effekte durch eine verminderte Leukozytenrekrutierung in der pulmonalen Mikrozirkulation und eine signifikant verbesserte kapillare Perfusion charakterisiert sind.

Wie bereits ausgeführt, führt die ausgedehnte Leberresektion zu einer vermehrten Leukozytenadhärenz in den pulmonalen Venolen, Arteriolen und im Kapillarbett. Die Vorbehandlung mit dem XOR-Inhibitor Febuxostat konnte die Anzahl an adhärenenten Leukozyten in den pulmonalen Arteriolen, pulmonalen Venolen im pulmonalen Kapillarbett signifikant reduzieren. Die verminderte Leukozytenrekrutierung in der pulmonalen Mikrozirkulation führte zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl MPO-positiver Zellen im pulmonalen Gewebe.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der XOR die Expression von P-Selektin in der Lunge bei einer systemischen Entzündungsreaktion reduziert (Folch et al., 1999). Daher könnte die Reduktion der Leukozytenrekrutierung in der Lunge nach ausgedehnter Leberresektion durch eine verminderte Expression von P-Selektin auf dem Endothel der pulmonalen Gefäße erklärt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Immunoneutralisation von PSGL-1 zu einer Inhibition des Leukozyten-Rollings sowie der Leukozyten-Adhärenz in pulmonalen Gefäßen bei einem septischen Lungenschaden führt (Roller et al., 2013). Jedoch wurde in unserer Studie durch die Vorbehandlung mit Febuxostat die Anzahl an rollenden Leukozyten in den pulmonalen Venolen und pulmonalen Arteriolen nicht gesenkt. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Leukozyten-Adhärenz nicht vollständig abhängig von der Reduktion des P-Selektin vermittelten

Leukozyten-Rolling ist. Wie bereits im oberen Abschnitt erklärt, ist die Leukozytenadhärenz in den Gefäßen der Lunge nicht unbedingt abhängig vom ersten Schritt der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, dem Rolling (Wang et al., 2013;B).

Weiterhin gibt es vermehrt Hinweise dafür, dass Thrombozyten die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Lungengefäßen beeinflussen (Zarbock und Ley, 2009). Thrombozyten binden über den von-Willebrand Faktor (vWF) an Endothelzellen. Thrombozyten können über die Bindung von thrombozytärem Glykoprotein-1b an leukozytäres Makrophagen-1 Antigen die Leukozyten-Adhärenz an das mikrovaskuläre Endothel vermitteln (Simon et al., 2000). Hierbei ist zu betonen, dass die XOD in Endothelzellen über die Produktion von ROS die Expression des vWF mitreguliert und damit die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflusst (Terrisse et al., 2010). Insbesondere in einem ALI scheint dieser pathophysiologische Vorgang von zentraler Bedeutung zu sein. Zarbock konnte zeigen, dass die Reduktion der Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion ein ALI verhindert (Zarbock et al., 2006). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die verminderte Anzahl an adhärenenten Leukozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation teilweise durch die Reduktion der thrombozytär vermittelten Leukozyten-Adhärenz zu erklären ist.

Die präoperative Applikation von Febuxostat führte zu keiner Reduktion des Leukozyten-Trappings im pulmonalen Kapillarfeld. Diese Erkenntnis muss erneut in Verbindung mit der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Kapillarfeld betrachtet werden. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass das Leukozyten-Trapping in pulmonalen Kapillaren hauptsächlich mechanisch reguliert wird. Entsprechend hatte sich erwiesen, dass die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen zum vermehrten Leukozyten-Trapping in pulmonalen Kapillaren führt. In unserer Studie zeigte die Inhibition der XOD keinen Einfluss auf das Leukozyten-Trapping in den pulmonalen Kapillaren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Inhibition der XOR keinen Einfluss auf die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen hat (Kurose et al., 1997).

Interessanterweise zeigte sich nach Inhibition der XOR durch Febuxostat eine signifikant erhöhte funktionelle Kapillardichte. Auch Cetinkale et al. zeigten, dass eine Hemmung der XOR einen Schaden in den Kapillargefäßen nach Verbrennungen vermindert (Cetinkale et al., 1997).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine reduzierte funktionelle Kapillardichte mit einem

erhöhten Leukozyten-Trapping in den pulmonalen Kapillaren und der konsekutiven Obstruktion dieser Kapillaren korreliert (Roller, Wang et al. 2013). In unserer Studie konnten wir jedoch eine erhaltene funktionelle Kapillardichte ohne Beeinflussung des Leukozyten-Trappings durch die Inhibition von Febuxostat beobachten.

Eine mögliche Erklärung könnte ein reduziertes pulmonales interstitielles Ödem nach Inhibition der XOR sein. Adkins et al. zeigten das die Hemmung der XOD in einem Ischämie/Reperfusion Modell die kapilläre Integrität aufrechterhält (Adkins und Taylor, 1990). Wie bereits ausgeführt, konnte in der vorliegenden Arbeit in allen Gruppen kein Unterschied der Wet-to-Dry Weight Ratio und damit in der Ausprägung eines pulmonalen Ödems festgestellt werden. Woraus zu schließen ist, dass die erhöhte kapilläre Perfusion in unserem Modell nicht auf die Reduktion des pulmonalen Ödems zurückzuführen ist. Entsprechend ist zu schließen, dass die Behandlung mit Febuxostat zu einer Verbesserung der pulmonalen kapillaren Perfusion führt, jedoch sind die genauen Mechanismen weiterhin nicht geklärt.

Wie bereits beschrieben, führt die Akkumulation von aktivierten Leukozyten in der Lunge zu einem Schaden am pulmonalen Gewebe. Die Ausschüttung von zytotoxischen Stoffen, wie ROS, kann eine Apoptose von pulmonalen Epithelzellen induzieren (Chopra et al., 2009; Serrao et al., 2001). Neben der signifikanten Reduktion an adhärenenten Leukozyten in den Gefäßen führt die Applikation von Febuxostat ebenfalls zu einer verminderten Aktivität der MPO im Gewebe. Auch die Apoptose konnte im Lungengewebe signifikant reduziert werden. Dies zeigt, dass der Schaden im Lungengewebe durch die Applikation von Febuxostat reduziert werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der XOR eine Reduktion der Leukozytenrekrutierung in pulmonalen Venolen und Arteriolen sowie eine signifikante Verbesserung der kapillaren Perfusion 24h nach ausgedehnter Leberresektion zur Folge hat. Dadurch konnte die Apoptose im Lungenparenchym signifikant reduziert und so das Lungengewebe geschützt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können helfen, sekundäre pulmonale Komplikationen nach leberchirurgischen Eingriffen zu reduzieren.

8.2.3 Einfluss der simultanen Splenektomie auf die Leukozytenakkumulation in der Lunge

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass eine simultan zur Leberresektion durchgeführte Milzresektion keinen Einfluss auf die Leukozytenadhärenz in der pulmonalen Mikrozirkulation hat. Interessanterweise zeigte sich die MPO-Expression im pulmonalen Gewebe signifikant reduziert. Die simultane Splenektomie zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Apoptoserate im pulmonalen Gewebe.

Es wurde bereits gezeigt, dass eine Splenektomie die Produktion von Zytokinen, Immunglobulinen und anderen immunreaktiven Faktoren und insbesondere von TNF- α reduziert (Jiang et al., 2007). Proinflammatorische Zytokine führen zu einer verstärkten Expression leukozytärer Adhäsionsmoleküle in der pulmonalen Mikrozirkulation (Wang et al., 2013;A; Wang et al., 2013;B). In der vorliegenden Arbeit konnten wir jedoch keinen Abfall der Leukozytenadhärenz in den verschiedenen Gefäßabschnitten der Lunge durch die Splenektomie beobachten.

Es wurde gezeigt, dass es nach Milzresektion zu einem systemischen Anstieg an Thrombozyten kommt (Sit et al., 2014). Wie bereits erwähnt, kann das Leukozyten-Trapping in pulmonalen Kapillaren durch eine Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen verstärkt werden (Roller et al., 2013). Eine simultan zur Leberresektion durchgeführte Milzresektion zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl an Leukozyten im pulmonalen Kapillarbett.

Neben der Beteiligung an der Expression von leukozytären Adhäsionsmolekülen ist TNF- α an der Induktion der Apoptose beteiligt (Hatano et al., 2000). Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass eine Splenektomie die Apoptoserate in der Lunge in Ischämie/Reperusions Modellen reduziert (Jiang et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine signifikante Reduktion der Apoptoserate in der Lunge durch eine simultan zu Leberresektion durchgeführten Milzresektion beobachtet werden.

Erneut fällt auf, dass sich die funktionelle Kapillardichte, trotz eines unveränderten Leukozyten-Trappings in den pulmonalen Kapillaren nach einer simultaner zur Leberresektion durchgeführten Splenektomie, vergrößert zeigte. Wie bereits ausgeführt konnte in der

vorliegenden Arbeit in allen Gruppen keinen Unterschied der Wet-to-Dry Weight Ratio und damit in der Ausprägung eines pulmonalen Ödems festgestellt werden. Daraus ist zu schließen, dass die erhöhte kapilläre Perfusion in unserem Modell nicht auf die Reduktion des pulmonalen Ödems zurückzuführen ist. Daher kann gesagt werden, dass eine simultan zur ausgedehnten Leberresektion durchgeführte Milzresektion zu einer Verbesserung der kapillaren Perfusion führt. Die genauen Mechanismen sind jedoch weiterhin nicht geklärt.

Interessant ist, dass die MPO-Expression im Lungengewebe durch eine simultan zur Leberresektion durchgeführten Milzresektion signifikant reduziert werden kann. Bereits andere Studien konnten zeigen, dass der durch ein Ischämie/Reperfusionsschaden induzierte MPO Anstieg im Lungengewebe reduziert werden konnte (Savas et al., 2003). Die MPO-Expression ist ein Marker für die Menge an aktivierten neutrophilen Granulozyten im Gewebe (Bradley et al., 1982). Das mononukleäre phagozytische System (MPS) ist mitverantwortlich für die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α oder IL-6 (Savas, Ozogul et al. 2003). Diese Zytokine sind bei der Leukozytenrekrutierung in das Lungengewebe von zentraler Bedeutung (Lukacs et al., 1995; Suwa et al., 2001). Savas et al. führten aus, dass durch die Milzresektion die Masse des MPS eingeschränkt wird, sodass weniger Zytokine ausgeschüttet werden (Savas, Ozogul et al. 2003). Dadurch wird auch die verminderte MPO-Aktivität und Leukozytenrekrutierung im Lungengewebe erklärt.

Wie bereits mehrfach beschrieben, läuft die Leukozytenrekrutierung in das Gewebe in mehreren Schritten ab. Die Leukozytenadhärenz stellt einen frühen Zeitpunkt im Prozess der Leukozytentransmigration und die Leukozytenakkumulation im Gewebe den letzten Schritt der Leukozytenrekrutierung dar. Da sich 24h nach Operation in der Mikrozirkulation unverändert viele Leukozyten befinden und im Gewebe signifikant weniger Leukozyten sind, ist zu vermuten, dass der Prozess der Leukozytenrekrutierung durch eine simultan zur ausgedehnten Leberresektion durchgeführte Milzresektion verzögert wird.

Dahingehend sind weitere Studien nötig, um zu klären, ob eine simultan zur ausgedehnten Leberresektion vollzogene Milzresektion protektive Wirkung auf das Lungengewebe hat oder der Eingriff gegebenenfalls den Prozess nur verzögert.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne deren Unterstützung das Erstellen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M.D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, für die Überlassung des Themas sowie die herausragenden Möglichkeiten dieses zu bearbeiten.

Herrn Dr. Dr. J. Roller möchte ich dafür danken, dass er mich mit unermüdlicher Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche sowie der Analyse und Interpretation der Ergebnisse aber auch in anderen Belangen der Arbeit unterstützt hat.

Weiterhin danke ich Frau Dr. rer. nat. C. Scheuer und Frau J. Becker für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der in vitro Versuche und der histologischen Untersuchungen.

Meinen Kollegen am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bin ich für das nette Arbeitsklima, insbesondere im „CapImage Raum“ dankbar.

Außerdem möchte ich ganz besonders meiner Familie danken: Mama, Papa, Stefan, Eva, Karl, Anne, Ante, Elisabeth, Kathi, Ubbo und Alex. Vielen Dank, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

10. Lebenslauf

11. Veröffentlichungen

11.1 Abstracts/Manuskripte

1. Extended liver resection causes a leukocyte infiltration of the lung with increased leukocyte recruitment in pulmonary arterioles, capillaries and venules

J. Roller, M. Schultheis, Y. Wang, C. Scheuer, H. Thorlacius, M. Glanemann, M. D. Menger

2. Febuxostat reduces microvascular leukocyte accumulation and apoptotic cell death in the lung after extended liver resection

J. Roller, M. Schultheis, Y. Wang, C. Scheuer, H. Thorlacius, M. Glanemann, M. D. Menger

11.2 Kongressbeiträge/zitierfähiges Abstract

Am 132. Kongress der Gesellschaft für Chirurgie in München

Febuxostat reduces leukocyte accumulation in the microvasculature of the lung after partial liver resection

J. Roller, M. Schultheis, J. Schuld, C. Ziemann, M. von Heesen, M. Glanemann, M. D. Menger

12. Quellen

1. Adkins, W. K., & Taylor, A. E. (1990). Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *J Appl Physiol* (1985), 69, 2012-2018.
2. Anderhuber, F., & Bremer, A. (2003). Leber, Hepar. In J. Fanghänel, F. Pera, F. Anderhuber & R. Nitsch (Eds.), *Waldeyer - Anatomie des Menschen* (17 ed., pp. 954-964): Walter de Gruyter.
3. Anup, R., Susama, P., & Balasubramanian, K. A. (2000). Role of xanthine oxidase in small bowel mucosal dysfunction after surgical stress. *Br J Surg*, 87,
4. Ates, M., Kinaci, E., Dirican, A., Sarici, B., Soyer, V., Koc, S., & Yilmaz, S. (2015). Pulmonary Complications After 1,150 Living Donor Hepatectomies. *Transplant Proc*, 47, 1319-1322.
5. Atherton, A., & Born, G. V. (1973). Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J Physiol*, 233, 157-165.
6. Baker, M., & Wayland, H. (1974). On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res*, 7, 131-143.
7. Battelli, M. G., Bolognesi, A., & Polito, L. (2014). Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 1502-1517.
8. Battelli, M. G., Musiani, S., Valgimigli, M., Gramantieri, L., Tomassoni, F., Bolondi, L., & Stirpe, F. (2001). Serum xanthine oxidase in human liver disease. *Am J Gastroenterol*, 96, 1194-1199.
9. Beauchamp, D., Holzmann, M., & Fabian, T. (2004). Spleen. In C. Townsend, D. Beauchamp, B. Evers & K. Mattox (Eds.), *Sabiston Textbook of Surgery* (17 ed., pp. 1679-1710).
10. Benzoni, E., Lorenzin, D., Baccarani, U., Adani, G. L., Favero, A., Cojutti, A., Bresadola, F., & Uzzau, A. (2006). Resective surgery for liver tumor: a multivariate analysis of causes and risk factors linked to postoperative complications. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 5, 526-533.
11. Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., LeGall, J. R., Morris, A., & Spragg, R. (1994). Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *J Crit Care*, 9, 72-81.
12. Bhatia, M., & Moochhala, S. (2004). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*, 202, 145-156.

13. Bhatia, M., Zemans, R. L., & Jeyaseelan, S. (2012). Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46, 566-572.
14. Bienvenu, K., & Granger, D. N. (1993). Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol*, 264, H1504-1508.
15. Boermeester, M. A., Houdijk, A. P., Meyer, S., Cuesta, M. A., Appelmelk, B. J., Wesdorp, R. I., Hack, C. E., & Van Leeuwen, P. A. (1995). Liver failure induces a systemic inflammatory response. Prevention by recombinant N-terminal bactericidal/permeability-increasing protein. *Am J Pathol*, 147, 1428-1440.
16. Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101, 1644-1655.
17. Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78, 206-209.
18. Brealey, D., & Singer, M. (2000). Multi-organ dysfunction in the critically ill: effects on different organs. *J R Coll Physicians Lond*, 34, 428-431.
19. Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M., & Treacher, D. F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, 368, 157-169.
20. Cetinkale, O., Demir, M., Sayman, H. B., Ayan, F., & Onsel, C. (1997). Effects of allopurinol, ibuprofen and cyclosporin A on local microcirculatory disturbance due to burn injuries. *Burns*, 23, 43-49.
21. Chen, W. Z., Hu, K. P., Xu, R. Y., & Pan, W. D. (2013). Beneficial effect of splenic artery ligation on bacterial translocation after major liver resection in rats. *Dig Liver Dis*, 45, 233-237.
22. Choi, B. Y., & Nguyen, M. H. (2005). The diagnosis and management of benign hepatic tumors. *J Clin Gastroenterol*, 39, 401-412.
23. Chopra, M., Reuben, J. S., & Sharma, A. C. (2009). Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234, 361-371.
24. Christensen, B. E., Jonsson, V., Matre, R., & Tonder, O. (1978). Traffic of T and B lymphocytes in the normal spleen. *Scand J Haematol*, 20, 246-257.
25. Cliff, W. J. (1966). The acute inflammatory reaction in the rabbit ear chamber with particular reference to the phenomenon of leukocytic migration. *J Exp Med*, 124, 543-556.
26. Couinaud, C. (1957). Le Foie. Etudes anatomiques et chirurgicales.

27. Crandall, M., Shapiro, M. B., & West, M. A. (2009). Does splenectomy protect against immune-mediated complications in blunt trauma patients? *Mol Med*, 15, 263-267.
28. Cummings, R. D. (1999). Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz J Med Biol Res*, 32, 519-528.
29. Dagbert, F., Thievenaz, R., Decullier, E., Bakrin, N., Cotte, E., Rousset, P., Vaudoyer, D., Passot, G., & Glehen, O. (2016). Splenectomy Increases Postoperative Complications Following Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*.
30. Demirel, U., Yalniz, M., Aygun, C., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, K., Ozercan, I. H., & Bahcecioglu, I. H. (2012). Allopurinol ameliorates thioacetamide-induced acute liver failure by regulating cellular redox-sensitive transcription factors in rats. *Inflammation*, 35, 1549-1557.
31. Dimitroulis, D., Tsaparas, P., Valsami, S., Mantas, D., Spartalis, E., Markakis, C., & Kouraklis, G. (2014). Indications, limitations and maneuvers to enable extended hepatectomy: current trends. *World J Gastroenterol*, 20, 7887-7893.
32. Doerschuk, C. M. (2001). Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation*, 8, 71-88.
33. Doerschuk, C. M., Allard, M. F., Martin, B. A., MacKenzie, A., Autor, A. P., & Hogg, J. C. (1987). Marginated pool of neutrophils in rabbit lungs. *J Appl Physiol* (1985), 63, 1806-1815.
34. Doerschuk, C. M., Beyers, N., Coxson, H. O., Wiggs, B., & Hogg, J. C. (1993). Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *J Appl Physiol* (1985), 74, 3040-3045.
35. Du, L., Zhou, J., Zhang, J., Yan, M., Gong, L., Liu, X., Chen, M., Tao, K., Luo, N., & Liu, J. (2012). Actin filament reorganization is a key step in lung inflammation induced by systemic inflammatory response syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 47, 597-603.
36. Dushianthan, A., Grocott, M. P., Postle, A. D., & Cusack, R. (2011). Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad Med J*, 87(1031), 612-622.
37. Eaton, M. A., Valentine, J., Jackson, M. R., Modrall, G., & Clagett, P. (2000). Incidental splenic injury during abdominal vascular surgery: a case-controlled analysis. *J Am Coll Surg*, 190, 58-64.
38. Fang, H., Jiang, W., Cheng, J., Lu, Y., Liu, A., Kan, L., & Dahmen, U. (2015). Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis. *J Immunol Res*, 2015, 187048.
39. Feuerhake, F., Fuchsl, G., Bals, R., & Welsch, U. (1998). Expression of inducible cell adhesion molecules in the normal human lung: immunohistochemical study of their distribution in pulmonary blood vessels. *Histochem Cell Biol*, 110, 387-394.

40. Folch, E., Salas, A., Panes, J., Gelpi, E., Rosello-Catafau, J., Anderson, D. C., Navarro, S., Pique, J. M., Fernandez-Cruz, L., & Closa, D. (1999). Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress. *Ann Surg*, 230, 792-798; discussion 798-799.
41. Force, A. D. T., Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., Ferguson, N. D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L., & Slutsky, A. S. (2012). Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, 307, 2526-2533.
42. Fulkerson, W. J., MacIntyre, N., Stamler, J., & Crapo, J. D. (1996). Pathogenesis and treatment of the adult respiratory distress syndrome. *Arch Intern Med*, 156, 29-38.
43. Gans, H., Mori, K., Matsumoto, K., & Tan, B. H. (1974). Evaluation of the effects of the finger fracture technique used in hepatic resection. *Surg Gynecol Obstet*, 138, 885-890.
44. Garcia-Tsao, G., Albillos, A., Barden, G. E., & West, A. B. (1993). Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology*, 17, 1081-1085.
45. Gavins, F. N., Dalli, J., Flower, R. J., Granger, D. N., & Perretti, M. (2007). Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *FASEB J*, 21, 1751-1758.
46. Gebb, S. A., Graham, J. A., Hanger, C. C., Godbey, P. S., Capen, R. L., Doerschuk, C. M., & Wagner, W. W., Jr. (1995). Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol* (1985), 79, 493-497.
47. Glanemann, M., Eipel, C., Nüssler, A. K., Vollmar, B., & Neuhaus, P. (2005). Hyperperfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res*, 37, 335-341.
48. Granger, D. N., Hollwarth, M. E., & Parks, D. A. (1986). Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl*, 548, 47-63.
49. Greene, A. K., & Puder, M. (2003). Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg*, 16, 99-102.
50. Grum, C., Ragsdale, R., Ketai, L., & Simon, R. (1987). Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care*.
51. Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, 33, 774-797.
52. Harrison, R. (2004). Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev*, 36, 363-375.
53. Hatakeyama, N., & Matsuda, N. (2014). Alert cell strategy: mechanisms of inflammatory response and organ protection. *Curr Pharm Des*, 20, 5766-5778.
54. Hatano, E., Bradham, C. A., Stark, A., Iimuro, Y., Lemasters, J. J., & Brenner, D. A. (2000). The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *J Biol Chem*, 275, 11814-11823.

55. Hirokawa, F., Hayashi, M., Miyamoto, Y., Asakuma, M., Shimizu, T., Komeda, K., Inoue, Y., Takeshita, A., Shibayama, Y., & Uchiyama, K. (2013). Surgical outcomes and clinical characteristics of elderly patients undergoing curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg*, 17, 1929-1937.
56. Huwer, H., Nikoloudakis, N., Rissland, J., Vollmar, B., Menger, M. D., & Schafers, H. J. (1998). In vivo analysis of microvascular injury after myocardial cryothermia. *J Surg Res*, 79, 1-7.
57. Ipaktchi, K., Mattar, A., Niederbichler, A. D., Hoesel, L. M., Vollmannshauser, S., Hemmila, M. R., Su, G. L., Remick, D. G., Wang, S. C., & Arbabi, S. (2006). Attenuating burn wound inflammatory signaling reduces systemic inflammation and acute lung injury. *J Immunol*, 177, 8065-8071.
58. Jarasch, E. D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H. W., Keenan, T. W., & Franke, W. W. (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*, 25, 67-82.
59. Jarnagin, W. R., Gonen, M., Fong, Y., DeMatteo, R. P., Ben-Porat, L., Little, S., Corvera, C., Weber, S., & Blumgart, L. H. (2002). Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg*, 236, 397-406; discussion 406-397.
60. Jiang, H., Meng, F., Li, W., Tong, L., Qiao, H., & Sun, X. (2007). Splenectomy ameliorates acute multiple organ damage induced by liver warm ischemia reperfusion in rats. *Surgery*, 141, 32-40.
61. Jin, S., Fu, Q., Wuyun, G., & Wuyun, T. (2013). Management of post-hepatectomy complications. *World J Gastroenterol*, 19, 7983-7991.
62. Jonas, S., Thelen, A., Benckert, C., Spinelli, A., Sammain, S., Neumann, U., Rudolph, B., & Neuhaus, P. (2007). Extended resections of liver metastases from colorectal cancer. *World J Surg*, 31, 511-521.
63. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., & Stegmaier, C. (2015). Ergebnisse nach ICD-10 Leber C22 Krebs in Deutschland 2011/2012 (10 ed.). Berlin 2015: Robert Koch-Institut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. .
64. Kandasamy, K., Sahu, G., & Parthasarathi, K. (2012). Real-time imaging reveals endothelium-mediated leukocyte retention in LPS-treated lung microvessels. *Microvasc Res*, 83, 323-331.
65. Kanematsu, T., Takenaka, K., Furuta, T., Ezaki, T., Sugimachi, K., & Inokuchi, K. (1985). Acute portal hypertension associated with liver resection. Analysis of early postoperative death. *Arch Surg*, 120, 1303-1305.
66. Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., Kato, A., Yoshitomi, H., Nozawa, S., Furukawa, K., Mitsuhashi, N., Sawada, S., Takeuchi, D., Ambiru, S., & Miyazaki, M. (2006). Circulating cytokines, chemokines, and stress hormones are increased in patients with organ dysfunction following liver resection. *J Surg Res*, 133, 102-112.

67. Kirschenbaum, L. A., Aziz, M., Astiz, M. E., Saha, D. C., & Rackow, E. C. (2000). Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions on cell filtration in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, 1602-1607.
68. Kleshnin, M., Shirmanova, M., Fiks, I., Orlova, A., Plekhanov, A., Zagainova, E., Lukyanov, S., & Turchin, I. (2015). Trans-illumination fluorescence imaging of deep- seated tumors in small animals. *Photon Lasers Med*.
69. Klyszcz, T., Junger, M., Jung, F., & Zeintl, H. (1997). [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)*, 42, 168-175.
70. Kollmar, O., Rupertus, K., Scheuer, C., Junker, B., Tilton, B., Schilling, M. K., & Menger, M. D. (2007). Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia*, 9, 862-870.
71. Kornasiewicz, O., Ligocka, J., & Krawczyk, M. (2014). Liver resection for non-colorectal, non-endocrine liver metastasis. *Pol Przegl Chir*, 86, 544-551.
72. Kuebler, W. M., Kuhnle, G. E., Groh, J., & Goetz, A. E. (1994). Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol (1985)*, 76, 65-71.
73. Kuhnle, G. E., Leipfinger, F. H., & Goetz, A. E. (1993). Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol (1985)*, 74, 1462-1471.
74. Kurosaki, M., Li Calzi, M., Scanziani, E., Garattini, E., & Terao, M. (1995). Tissue- and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem J*, 306 (Pt 1), 225-234.
75. Kurose, I., Argenbright, L. W., Wolf, R., Lianxi, L., & Granger, D. N. (1997). Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 2), H2976-2982.
76. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
77. Lang, H. (2007). Technik der Leberresektion *Chirurg*, 78(9), 849-866.
78. Laschke, M. W., Dold, S., Menger, M. D., Jeppsson, B., & Thorlacius, H. (2008). Platelet-dependent accumulation of leukocytes in sinusoids mediates hepatocellular damage in bile duct ligation-induced cholestasis. *Br J Pharmacol*, 153, 148-156.
79. Laschke, M. W., Elitzsch, A., Vollmar, B., & Menger, M. D. (2005). In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril*, 84 Suppl 2, 1199-1209.
80. Lee, S. G., & Hwang, S. (2005). How I do it: assessment of hepatic functional reserve for indication of hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 12, 38-43.

81. Lefor, A., & Phillips, E. (2008). Spleen. In J. Norton, P. S. Barie, R. R. Bollinger, A. E. Chang, S. Lowry, S. J. Mulvihill, H. I. Pass & R. W. Thompson (Eds.), *Surgery Basic Science and Clinical Evidence* (2 ed., pp. 1111-1132): Springer-Verlag New York.
82. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-689.
83. Looney, M. R., Thornton, E. E., Sen, D., Lamm, W. J., Glenney, R. W., & Krummel, M. F. (2011). Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nat Methods*, 8, 91-96.
84. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
85. Lukacs, N. W., Strieter, R. M., Chensue, S. W., Widmer, M., & Kunkel, S. L. (1995). TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol*, 154, 5411-5417.
86. M. Melter , J. V., D. Grothues, B. Knoppke. (2012). Pädiatrische Lebertransplantation. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 160, 343-357.
87. Makgoba, M. W., Sanders, M. E., Ginther Luce, G. E., Dustin, M. L., Springer, T. A., Clark, E. A., Mannoni, P., & Shaw, S. (1988). ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature*, 331
88. Marik, P. E., & Flemmer, M. (2012). The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg*, 73, 801-808.
89. Matthay, M. A., Ware, L. B., & Zimmerman, G. A. (2012). The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 122, 2731-2740.
90. Matuschak, G. M., & Rinaldo, J. E. (1988). Organ interactions in the adult respiratory distress syndrome during sepsis. Role of the liver in host defense. *Chest*, 94, 400-406.
91. McCormack, D. G., Mehta, S., Tyml, K., Scott, J. A., Potter, R., & Rohan, M. (2000). Pulmonary microvascular changes during sepsis: evaluation using intravital videomicroscopy. *Microvasc Res*, 60, 131-140
92. Medzhitov, R., & Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med*, 343, 338-344.
93. Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9, 4-9.
94. Mempel, T. R., Moser, C., Hutter, J., Kuebler, W. M., & Krombach, F. (2003). Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy. *J Vasc Res*, 40, 435-441.
95. Meneshian, A., & Bulkley, G. B. (2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*, 9, 161-175.

96. Menger, M. D., & Lehr, H. A. (1993). Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today*, 14, 519-522.
97. Monchi, M., Bellenfant, F., Cariou, A., Joly, L. M., Thebert, D., Laurent, I., Dhainaut, J. F., & Brunet, F. (1998). Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med*, 158, 1076-1081.
98. Neumann, U. P., Langrehr, J. M., Kaisers, U., Lang, M., Schmitz, V., & Neuhaus, P. (2002). Simultaneous splenectomy increases risk for opportunistic pneumonia in patients after liver transplantation. *Transpl Int*, 15, 226-232.
99. Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F., & Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J*, 275, 3278-3289
100. Nomura, J., Busso, N., Ives, A., Tsujimoto, S., Tamura, M., So, A., & Yamanaka, Y. (2013). Febuxostat, an inhibitor of xanthine oxidase, suppresses lipopolysaccharide-induced MCP-1 production via MAPK phosphatase-1-mediated inactivation of JNK. *PLoS One*, 8, e75527.
101. Oguz, A., Kapan, M., Kaplan, I., Alabalik, U., Ulger, B. V., Uslukaya, O., Turkoglu, A., & Polat, Y. (2015). The effects of sulforaphane on the liver and remote organ damage in hepatic ischemia-reperfusion model formed with pringle maneuver in rats. *Int J Surg*, 18, 163-168.
102. Pawlik, T. M., Scoggins, C. R., Zorzi, D., Abdalla, E. K., Andres, A., Eng, C., Curley, S. A., Loyer, E. M., Muratore, A., Mentha, G., Capussotti, L., & Vauthey, J. N. (2005). Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg*, 241, 715-722, discussion 722-714.
103. Rau, H. G., Schauer, R., Pickelmann, S., Beyer, B. C., Angele, M. K., Zimmermann, A., Meimarakis, G., Heizmann, O., & Schildberg, F. W. (2001). [Dissection techniques in liver surgery]. *Chirurg*, 72, 105-112.
104. Reddy, R. C., & Standiford, T. J. (2010). Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol*, 17, 18-24.
105. Reutershan, J., & Ley, K. (2004). Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care*, 8(6), 453-461.
106. Roller, J. (2010). Interaktion von Staphylokokkus aureus mit dem mikrovaskulären Endothel Eine in vivo Studie in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters. (Promotion), Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.
107. Roller, J., Laschke, M. W., Scheuer, C., & Menger, M. D. (2010). Heme oxygenase (HO)-1 protects from lipopolysaccharide (LPS)-mediated liver injury by inhibition of hepatic leukocyte accumulation and improvement of microvascular perfusion. *Langenbecks Arch Surg*, 395, 387-394.
108. Roller, J., Laschke, M. W., Tschernig, T., Schramm, R., Veith, N. T., Thorlacius, H., & Menger, M. D. (2011). How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung. *Nanomedicine*, 7, 753-762.

109. Roller, J., Wang, Y., Rahman, M., Schramm, R., Laschke, M. W., Menger, M. D., Jeppsson, B., & Thorlacius, H. (2013). Direct in vivo observations of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte-endothelial cell interactions in the pulmonary microvasculature in abdominal sepsis in mice. *Inflamm Res*, 62, 275-282.
110. Sanders, K. A., Huecksteadt, T., Xu, P., Sturrock, A. B., & Hoidal, J. R. (1999). Regulation of oxidant production in acute lung injury. *Chest*, 116(1 Suppl), 56S-61S.
111. Savas, C., Ozogul, C., Karaoz, E., Delibas, N., & Ozguner, F. (2003). Splenectomy reduces remote organ damage after intestinal ischaemia-reperfusion injury. *Acta Chir Belg*, 103, 315-320.
112. Scaife, C. (2008). Liver. In J. Norton, Barie, P.S., Bollinger, R.R., Chang, A.E., Lowry, S., Mulvihill, S.J., Pass, H.I., Thompson, R.W. (Ed.), *Surgery Basic Science and Clinical Evidence* (2 ed., pp. 943-963): Springer-Verlag New York
113. Schramm, R., Menger, M. D., Kirsch, S., Langer, F., Harder, Y., Hamacher, J., & Schafers, H. J. (2007). The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multifuorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 134, 210-217, 217 e211
114. Serrao, K. L., Fortenberry, J. D., Owens, M. L., Harris, F. L., & Brown, L. A. (2001). Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280, L298-305.
115. Shafik, A. N. (2013). Febuxostat improves the local and remote organ changes induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Dig Dis Sci*, 58, 650-659.
116. Short, A. C., Montoya, M. L., Gebb, S. A., Presson, R. G., Jr., Wagner, W. W., Jr., & Capen, R. L. (1996). Pulmonary capillary diameters and recruitment characteristics in subpleural and interior networks. *J Appl Physiol* (1985), 80, 1568-1573.
117. Simon, D. I., Chen, Z., Xu, H., Li, C. Q., Dong, J., McIntire, L. V., Ballantyne, C. M., Zhang, L., Furman, M. I., Berndt, M. C., & Lopez, J. A. (2000). Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*, 192, 193-204.
118. Sit, M., Yilmaz, E. E., Tosun, M., & Aktas, G. (2014). Effects of N-acetyl cysteine on lipid levels and on leukocyte and platelet count in rats after splenectomy. *Niger J Clin Pract*, 17, 343-345.
119. Song, T. J., Adusumilli, P., & Fong, Y. (2005). [Prognostic factors in the evaluation of colorectal liver metastases]. *Chirurg*, 76, 535-536, 538-542.
120. Steinbauer, M., Harris, A. G., Abels, C., & Messmer, K. (2000). Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg*, 385, 290-298.
121. Steinberg, K. P., Milberg, J. A., Martin, T. R., Maunder, R. J., Cockrill, B. A., & Hudson, L. D. (1994). Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(1), 113-122.

122. Strasberg, S. M. (2005). Nomenclature of hepatic anatomy and resections: a review of the Brisbane 2000 system. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 12, 351-355.
123. Sugawara, Y., Yamamoto, J., Shimada, K., Yamasaki, S., Kosuge, T., Takayama, T., & Makuuchi, M. (2000). Splenectomy in patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism. *J Am Coll Surg*, 190, 446-450.
124. Sunil, V. R., Connor, A. J., Zhou, P., Gordon, M. K., Laskin, J. D., & Laskin, D. L. (2002). Activation of adherent vascular neutrophils in the lung during acute endotoxemia. *Respir Res*, 3, 21.
125. Suwa, T., Hogg, J. C., Klut, M. E., Hards, J., & van Eeden, S. F. (2001). Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 970-976.
126. Tabuchi, A., Mertens, M., Kuppe, H., Pries, A. R., & Kuebler, W. M. (2008). Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol* (1985), 104, 338-346.
127. Terada, L. S., Hybertson, B. M., Connelly, K. G., Weill, D., Piermattei, D., & Repine, J. E. (1997). XO increases neutrophil adherence to endothelial cells by a dual ICAM-1 and P-selectin-mediated mechanism. *J Appl Physiol* (1985), 82, 866-873.
128. Terrisse, A. D., Puech, N., Allart, S., Gourdy, P., Xuereb, J. M., Payrastre, B., & Sie, P. (2010). Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *J Thromb Haemost*, 8, 2810-2819.
129. Thasler, W. E., Bein, T., & Jauch, K. W. (2002). Perioperative effects of hepatic resection surgery on hemodynamics, pulmonary fluid balance, and indocyanine green clearance. *Langenbecks Arch Surg*, 387, 271-275.
130. Thomas, S., Karnik, S., & Balasubramanian, K. A. (2002). Surgical manipulation of the small intestine and its effect on the lung. *J Surg Res*, 106, 145-156.
131. Tischoff, I., & Tannapfel, A. (2007). [Hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma--different prognosis, pathogenesis and therapy]. *Zentralbl Chir*, 132, 300-305.
132. Ulubay, G., Er Dedekarginoglu, B., Kupeli, E., Salman Sever, O., Oner Eyuboglu, F., & Haberal, M. (2015). Postoperative pulmonary complications in living-liver donors: a retrospective analysis of 188 patients. *Exp Clin Transplant*, 13 Suppl 1, 340-345.
133. Vollmar, B. (2011). [Pathophysiological basis of surgery-linked sepsis]. *Chirurg*, 82, 199-207.
134. Vollmar, B., Laschke, M. W., Rohan, R., Koenig, J., & Menger, M. D. (2001). In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol*, 159, 1661-1670.
135. Wagner, W. W., Jr., & Filley, G. F. (1965). Microscopic observation of the lung in vivo. *Vasc Dis*, 2, 229-241.

136. Wang, X., Parsson, H., Soltesz, V., Johansson, K., & Andersson, R. (1995). Bacterial translocation and intestinal capillary permeability following major liver resection in the rat. *J Surg Res*, 58, 351-358.
137. Wang, Y., Roller, J., Menger, M. D., & Thorlacius, H. (2013;A). Sepsis-induced leukocyte adhesion in the pulmonary microvasculature in vivo is mediated by CD11a and CD11b. *Eur J Pharmacol*, 702, 135-141.
138. Wang, Y., Roller, J., Slotta, J. E., Zhang, S., Luo, L., Rahman, M., Syk, I., Menger, M. D., & Thorlacius, H. (2013;B). Distinct patterns of leukocyte recruitment in the pulmonary microvasculature in response to local and systemic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 304, L298-305.
139. Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 342, 1334-1349.
140. Watt, D. G., McSorley, S. T., Horgan, P. G., & McMillan, D. C. (2015). Enhanced Recovery After Surgery: Which Components, If Any, Impact on The Systemic Inflammatory Response Following Colorectal Surgery?: A Systematic Review. *Medicine (Baltimore)*, 94, e1286.
141. Weinbroum, A., Nielsen, V. G., Tan, S., Gelman, S., Matalon, S., Skinner, K. A., Bradley, E., Jr., & Parks, D. A. (1995). Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *Am J Physiol*, 268(6 Pt 1), G988-996.
142. Werr, J., Xie, X., Hedqvist, P., Ruoslahti, E., & Lindbom, L. (1998). beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo. *J Exp Med*, 187(12), 2091-2096.
143. Williams, A. E., & Chambers, R. C. (2014). The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 306, L217-230.
144. Wittkopper, K., Emons, J., & El-Armouche, A. (2011). [Febuxostat]. *Dtsch Med Wochenschr*, 136(23), 1270-1274.
145. Worthen, G. S., Schwab, B., 3rd, Elson, E. L., & Downey, G. P. (1989). Mechanics of stimulated neutrophils: cell stiffening induces retention in capillaries. *Science*, 245, 183-186.
146. Wright, R. M., Ginger, L. A., Kosila, N., Elkins, N. D., Essary, B., McManaman, J. L., & Repine, J. E. (2004). Mononuclear phagocyte xanthine oxidoreductase contributes to cytokine-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30, 479-490.
147. Xu, C. P., Liu, J., Liu, J. C., Han, D. W., Zhang, Y., & Zhao, Y. C. (2007). Dynamic changes and mechanism of intestinal endotoxemia in partially hepatectomized rats. *World J Gastroenterol*, 13, 3592-3597.
148. Yoshida, N., Yoshikawa, T., Nakamura, Y., Sakamoto, K., Takenaka, S., Boku, Y., Kassai, K., & Kondo, M. (1997). Interactions of neutrophils and endothelial cells under low flow conditions in vitro. *Shock*, 8, 125-130.

149. Zarbock, A., & Ley, K. (2009). The role of platelets in acute lung injury (ALI). *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 150-158.
150. Zarbock, A., Singbartl, K., & Ley, K. (2006). Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest*, 116, 3211-3219.
151. Zhou, L., Zhao, D., An, H., Zhang, H., Jiang, C., & Yang, B. (2015). Melatonin prevents lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion through anti-inflammatory and anti-apoptosis effects. *Int Immunopharmacol*, 29, 462-467.